

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-510997

(P2001-510997A)

(43) 公表日 平成13年8月7日 (2001.8.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 38/00		25/00	
A 6 1 P 9/10		27/02	
25/00		29/00	
27/02		39/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号 特願平10-531780 (86) (22) 出願日 平成10年1月28日 (1998.1.28) (85) 翻訳文提出日 平成11年7月28日 (1999.7.28) (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 8 / 0 0 2 6 3 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 3 2 8 6 3 (87) 国際公開日 平成10年7月30日 (1998.7.30) (31) 優先権主張番号 9 7 0 1 7 1 0 . 7 (32) 優先日 平成9年1月28日 (1997.1.28) (33) 優先権主張国 イギリス (GB) (81) 指定国 EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, J P, K R, U S		(71) 出願人 カロ バイオ アクテブブラーグ スウェーデン, フディング 57, エスー 141, ノヴム (72) 発明者 スバイロウ, ジアニス スウェーデン, フディング 57, エスー 141, デパートメント オブ バイオサイ エンシーズ アット ノヴム, カロリンス カ インスティテュート (74) 代理人 弁理士 達山 勉 (外3名)	

(54) 【発明の名称】 哺乳類チオレドキシン

(57) 【要約】

本発明は、チオレドキシン及びその使用方法に関する。

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : C12N 15/53, 15/85, 9/02, 15/70, 5/10, A61K 38/44, C12N 1/21, G01N 33/68, C07K 16/40, C12Q 1/68, A01K 67/027</p>	<p>A2</p>	<p>(11) International Publication Number: <b>WO 98/32863</b>  (43) International Publication Date: 30 July 1998 (30.07.98)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/GB98/00263  (22) International Filing Date: 28 January 1998 (28.01.98)  (30) Priority Data: 9701710.7 28 January 1997 (28.01.97) GB  (71) Applicants (for all designated States except US): KARO BIO AB [SE/SE]; Novum, S-141 57 Huddinge (SE). DEAN, John, Paul [GB/GB]; Withers &amp; Rogers, 4 Dyer's Buildings, Holborn, London EC1N 2JT (GB).  (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): SPYROU, Giannis [SE/SE]; Karolinska Institutet, Dept. of Biosciences at Novum, S-141 57 Huddinge (SE).  (74) Agent: DEAN, John, Paul; Withers &amp; Rogers, 4 Dyer's Buildings, Holborn, London EC1N 2JT (GB).</p>	<p>(81) Designated States: AU, CA, JP, KR, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Published</b> <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i></p>	
<p>(54) Title: MAMMALIAN THIOREDIXIN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>This invention relates to a thioredoxin and to methods for its use.</p>		

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

## MAMMALIAN THIOREDOXIN

This invention relates to the isolation and characterisation of nucleic acid encoding for a new mammalian thioredoxin and to a protein or polypeptide produced from such nucleic acid.

Thioredoxin (Trx) is a 12-kDa protein, known to be present in many prokaryotes and eukaryotes and appears to be truly ubiquitous in all living cells (Holmgren, A. (1984). *Methods Enzymol.* 107, 295-300, Holmgren, A. (1985). *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237-271). It is characterized by an active site sequence -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-, which has been conserved throughout evolution. The active site of thioredoxin is localised in a protrusion of its three dimensional structure (Jeng, M. F. *et al* (1994) *Structure* 2, 853-868) and the two cysteine residues provide the sulfhydryl groups involved in Trx-dependent reducing activity. Oxidized thioredoxin, Trx-S<sub>2</sub>, is reduced to Trx-(SH)<sub>2</sub> by the flavoenzyme thioredoxin reductase (TR) and NADPH (the thioredoxin system) (Holmgren, A. (1985) *supra*).

Mammalian thioredoxins isolated from several sources (e.g. rat and calf liver, rabbit bone marrow and human placenta) have certain structural differences with respect to those from prokaryotes. In addition to the active site cysteine residues, two or three (depending on the Trx source) additional structural cysteine residues exist in the C-terminal half of the molecule. Oxidation of these residues leads to a loss of its enzymatic activity (Ren, X *et al.* (1993) *Biochemistry* 32, 9701-9708).

More than one thioredoxin exists in many eukaryotes, e.g. yeast (Muller E. G. (1992) *Yeast* 8, 117-120). However, only one thioredoxin (Trx 1) has thus far been cloned from mammalian cells.

Mammalian thioredoxin has been implicated in a wide variety of biochemical functions acting as hydrogen donor for ribonucleotide reductase (Thelander, L., Reichard, P. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 133-158) and methionine sulfoxide reductase (Holgren, A. (1985)

*Supra*), facilitating refolding of disulphide-containing proteins (Holmgren, A. (1988). In "Plasma Membrane oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth". "NATO ASI" series, eds, F.L. Grane *et al.*, Plenum Press, New York 295-302), (Lundstrom, J., Holgren, A. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 9114-91120)) and activating the glucocorticoid or IL-2 receptors (Grippio, J.F., Holgren, A., Pratt, W.B. (1985) *Biol. Chem.* **260**, 93-97), Tagaya, *et al* (1989) *EMBO J.* **8**, 757-764)). It can also modulate the DNA binding activity of some transcription factors either directly (TFIIIC(9), BZLF1(10) and NF-kB(11)) or indirectly (AP-1) through the nuclear factor Ref-1 which in turn is reduced by thioredoxin (Abate, C., *et al* (1990). *Science* **249**, 1157-1161). The importance of the redox regulation of transcription factors by thioredoxin is exemplified by the *v-fos* oncogene where a point mutation of Cys154/Ser results in constitutive activation of the AP-1 complex (Okuno, H. *et al* (1993) *Oncogene* **8**, 695-701). Thioredoxin can be secreted by cells using a leaderless pathway (Ericson, M.L., *et al* (1992) *Lymphokine & Cytokine Research* **11**, 201-207; Rubartelli, A., *et al* (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24161-24164; Rubartelli, A., *et al* (1995) *Cancer Res.* **55**, 675-680) and stimulate the proliferation of lymphoid cells, fibroblasts and a variety of human solid tumour cell lines (Wakasugi, N., *et al* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8282-8286; Oblong, J. E., *et al* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11714-11720; Nakamura, H., *et al* (1992) *Cancer* **69**, 2091-2097; Gasdaska, J.R., *et al* (1995) *Cell Growth & Differentiation* **6**, 1643-1650). Furthermore, Trx is an essential component of the early pregnancy factor (Clarke F. M. *et al.* (1991) *Reproduction & Fertility* **93**, 525-539), it inhibits HIV expression in macrophages (Newman, G.W. *et al* (1994) *J. Experim. Medicine* **180**, 359-363), can reduce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Spector A *et al* (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4984-4990), scavenge free radicals (Schallreuter K. U., Wood J. M. (1986) *Biochem Biophys. Res. Commun.* **136**, 630-637) and protect cells against oxidative stress (Nakamura, H. *et al* (1994) *Immunology Letters* **42**, 75-80).

The inventors have identified a novel mammalian thioredoxin which is functionally and structurally distinct from the previously known mammalian thioredoxin. This novel thioredoxin is known as Trx2.

Accordingly, a first aspect of the invention provides an isolated nucleic acid molecule encoding the Trx2 gene product or a polypeptide which is functionally similar to Trx2.

Preferably, the nucleic acid molecule comprises the nucleic acid sequence shown in Figure 1A or Figure 9.

The nucleic acid molecule may be cDNA.

Preferably the nucleic acid has at least 60%, 70% or 80% homology, more preferably 90% homology, to the nucleic acid sequences of Figure 1A or Figure 9 encoding the Trx2 gene product or a polypeptide which is functionally similar to Trx2. This allows, for example, for variations in the sequence which still allows the production of Trx2, by virtue of degeneracy of the genetic code.

It is intended that the term "functionally similar to Trx2" means the polypeptide has thioredoxin activity, as indicated, for example by the catalysis of disulphide reduction or insulin with NADPH in the presence of mammalian thioredoxin reductase which is resistant against oxidation compared to Trx1. The known Trx1 exhibits oxidation of cysteine residues which results in a loss of its enzymatic activity (Ren X *et al.* (1993) *Biochemistry* 32, 9701-9708). Trx2, however, lacks these cysteine residues.

A second aspect of the invention provides polypeptides, preferably mature proteins, encoded by nucleic acid according to the first aspect of the invention. Preferably, the polypeptide comprises the amino acid sequence of Figure 1A or Figure 10.

Analysis of the amino acid sequence of Trx2 indicates that it may be processed into a mature protein by enzymatic action. Accordingly, the invention also provides a mature protein, fragment, homologue or analogue which is at least functionally similar to Trx2. The invention also includes recombinant or synthetic polypeptides having the same or preferably better, functionality compared to native Trx2.

Preferably the mature protein comprises the amino acid sequence of Figure 1A from Thr 59 to Asp 166, or the sequence of Figure 10 from Leu 59 to Ile 166.

A further aspect of the invention provides plasmids or other vectors comprising nucleic acids according to the first aspect of the invention. Such plasmids or other vectors are preferably expression vectors of the sort known in the art, into which a nucleic acid according to the invention can be inserted.

Such plasmids or vectors may be inserted into a suitable microbial host, such as *E.coli*, or a suitable cell of the type known in the art for expression of the nucleic acid sequences of the invention such as a mammalian or insect cell. Accordingly, the invention provides bacterial, mammalian or insect cells comprising vectors or plasmids according to the invention.

Thioredoxin 2 (Trx2) is advantageous in that it is resistant to oxidation, and is translocated to mitochondria. Mitochondria are the sites of vital cellular functions such as lipid metabolism and aerobic respiration (oxidative phosphorylation). In respiration, incomplete reduction of dioxygen results in the formation of reactive oxygen intermediates, ROIs, (hydrogen peroxide, the superoxide anion  $O_2^-$  and the hydroxyl radical OH). Increased levels of ROIs, referred to as oxidative stress, can result in lipid peroxidation, inactivation of proteins and strand breakage in DNA. Thioredoxin can act as an antioxidative molecule and scavenge hydroxyl radicals, reduce hydrogen peroxide and reactivate proteins inactivated by oxidation.

Accordingly the invention provides therapeutic applications of Trx2 including protection against oxidative stress induced cytotoxicity and tissue damage. More specifically Trx2 may be used to protect against ischaemic damage, eye disease, radiation, and drug toxicity.

In relation to the treatment of ischaemic damage of organs, active oxygen species are thought to play a part in ischaemia reperfusion injury. In many heart attacks and strokes an ischaemic period is followed by a reperfusion period during which oxygen radicals are produced and probably are the true cause for heart attack and stroke damage. Trx2 may be used as protective compound to attenuate ischaemia reperfusion injury.

In relation to the treatment of eye diseases, many diseases of the eye including cataract involve photo-oxidative stress. Trx2 may be used for protection of retinal cells from damage caused by active oxygen species generated during oxygen stress to the retina.

In relation to the treatment of radiation, exposure to radiation is a major source of oxygen radical oxidation. Trx2 may be used as a radio-protective compound to attenuate the effects of radiation.

Finally, in relation to the treatment of drug toxicity, several commonly used drugs (eg. adriamycin) exhibit a variety of undesirable side effects caused by generation of reactive oxygen species. For example, in the use of adriamycin, where cardiotoxicity is the major form of damage, Trx2 can be used to eliminate side effects.

The invention will now be described by way of example only, and with reference to the accompanying Figures 1-15 in which:

Figure 1 shows cDNA, deduced amino acid sequence and predicted secondary structure of rat Trx2. A) The deduced amino acid sequence in the single letter code is shown under the nucleotide sequence. The active site is boxed and the potential polyadenylation signal is underlined. B) Secondary structure was predicted using the DNASTAR program and the Garnier-Robson algorithm. The Kyte-Doolittle algorithm was applied for the hydropathy blot of Trx2 amino acid sequence;

Figure 2 shows *in vitro* translation of Trx2 cDNA using the Sp6 RNA polymerase, the TNT coupled reticulocyte transcription translation system and [<sup>35</sup>S] methionine. The product was analyzed by SDS-PAGE;

Figure 3 shows alignment of the predicted amino acid sequence of rat Trx2 with that of human and rat Trx1. A) Analysis of the N-terminal part of the predicted rat Trx2 amino acid sequence. Secondary structure prediction of the region suggests an  $\alpha$  helix as indicated. The arrow indicates the probable mitochondrial signal peptide protease cleavage site as determined by the consensus motif for the cleavage by the two protease model



(Hendrick J. P., Hodges, P.E., Rosenberg, L.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4056-4060). In bold are; arginine at -10; hydrophobic residues at position -8; residues S, G and T present in position -5. B) The alignment is based on a three-dimensional structure of *E. coli* thioredoxin (Eklund, H., Gleason, F.K., Holmgren, A. (1991) *Proteins* 11, 13-28). Black boxes indicate conserved amino acid residues in human Trx, rat Trx1 and rat Trx2. The structure contains four  $\alpha$ -helices, a distorted  $3_{10}$  helix and five  $\beta$ -sheets as indicated below the amino acid sequence;

Figure 4 shows a phylogenetic tree. The phylogenetic tree was constructed by the Clustal method with the PAM250 residue weight table;

Figure 5 shows Northern blot analysis of Trx1 and Trx2 in rat tissues. Each lane contains 2  $\mu$ g poly(A)+ RNA. The blot was hybridized with the Trx1 and Trx2 probes as described under "Experimental Procedures". Tissues used for analysis are shown at the top. The estimated size of the mRNAs was 0.6 kb and 1.3 kb for Trx1 and Trx2, respectively;

Figure 6 shows RT-PCR analysis of transcripts encoding Trx1, and Trx2. One  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed and one  $\mu$ l was used as template for PCR with specific primers for Trx1, Trx2 and  $\beta$ -actin. The products were separated by agarose gel electrophoresis, transferred to membranes and probed with specific oligonucleotide probes;

Figure 7 shows immunoblotting analysis of cell fractions. Cell fractions were analyzed by SDS/PAGE and developed with anti-Trx2 antibodies. Lane 1,  $\Delta$ -Trx2 (5ng). Lane 2, total rat liver cell extract (15  $\mu$ g), Lane 3, cytosolic fraction (15  $\mu$ g), Lane 4, mitochondrial fraction (15  $\mu$ g). Lane 5, peroxisomal fraction (15  $\mu$ g). Lane 6, human Trx1 (5ng);

Figure 8 shows analysis of Trx activity. Oxidized Trx2 and human thioredoxin were assayed for their ability to reduce insulin in the presence or absence of DTT. The reaction was stopped after 20 min by the addition of 6 M guanidine-HCl, 1mM DTNB;

Figure 9 shows human Trx2 cDNA sequence;

Figure 10 shows the predicted human Trx2 amino acid sequence based on the cDNA sequence of Fig. 9;

Figure 11 shows two human liver cDNA sequences that code for proteins which interact with Trx2;

Figure 12 shows five rat brain cDNA sequences that code for proteins which interact with Trx2;

Figure 13 shows the human *trx2* gene;

Figure 14 shows a gel picture of a PCR product in chromosome 22; and

Figure 15 shows the mRNA levels of the human Trx2 analysed by using an RNA master blot (Clontech).

### 1. Cloning of rat thioredoxin 2

The primary structure of the active site of thioredoxin (VVVDFSATWCGPCK), which is conserved throughout evolution was used to design degenerate primers which were labelled with <sup>32</sup>P and used as probes for screening a rat heart cDNA library (Clontech) for novel thioredoxin genes. Approximately 1x10<sup>6</sup> plaques were screened according to the instructions of the manufacturer (Amersham) and a positive bacteriophage was isolated. The insert from the bacteriophage was excised, cloned into the TA-vector (Invitrogen) and sequenced. A 392 bp portion of the above clone was amplified by PCR (30 cycles at; 94°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min) with specific primers (*trx2f1*:

5'-AACCTTTATCGTCCAGGATGGAC-3' and *trx2r1*:

5'-GCTGGGAGTTCTACTAGGTTCC-3').

The PCR product was <sup>32</sup>P-labelled by random priming and used to rescreen the same library under high-stringency conditions. Hybridization was performed at 60°C in

Expresshyb hybridization solution (Clontech), followed by five 10 min washes in 2 x SSC-0.1%SDS (1 x SSC is 0.15M NaCl plus 0.15M sodium citrate) at room temperature and finally two 40 min washes in 0.1%SSC-0.1%SDS at 60°C. More than 600,000 clones were screened and 5 clones were isolated, cloned into the TA-vector and sequenced. All clones were overlapping and the longest one, Trx2, possessed an open reading frame of 501 bp beginning with an ATG initiation codon and ending with a TGA termination codon. To obtain the full length cDNA 5' Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) with nested PCR using oligonucleotide-anchored heart cDNA template (Clontech) in the presence of an anchor-specific primer and an antisense primer complementary to the 3' untranslated region of Trx2 (trx2r2: 5'-GCTGGGAGTTCTACTAGGTTCC-3') was performed as described in the Clontech protocol. PCR products were cloned into the TA-vector and sequenced. A cDNA fragment was amplified that overlapped Trx2 and encoded 46 bp of a novel 5' sequence including an in frame TGA stop codon upstream of the ATG initiation codon. The overall composite sequence consists of 1276 bp, including a stretch of 20 adenosines corresponding to the poly(A) tail and an AATAAAA motif, 18 bp upstream from the poly(A) tail. The open reading frame encodes a protein of 166 amino acids with a predicted mass of 18.2 kDa and a pI of 7.9 (Figures 1A, 1B).

In order to confirm that the open reading frame sequence present in the Trx2 clone is functional and codes for translatable protein, the cDNA was transcribed from the SP6 promoter of the TA-Trx2 clone and 0.5 µg was translated using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) and Sp6 RNA polymerase with incorporation of [<sup>35</sup>S]methionine for 60 min at 30°C. The translation products were analyzed by 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography. The results showed a 20-kDa translation product, indicating the presence of translatable, functional coding sequence (Figure 2).

## 2. Analysis of the deduced amino acid sequence

The N-terminal region of the protein has a high content of positively charged residues and secondary structure prediction indicated a potential  $\alpha$ -helix followed by  $\beta$ -sheets (Figure 1B).

These features are common to most mitochondrial targeting signal peptides (Neupert, W. (1994). *Clinical Investigator* **72**, 251-261) and an algorithm analysis of the partial amino acid composition, indicated mitochondrial intracellular localization (Newman, G. W. *et al* (1994). *J. Experim. Medicine* **180**, 359-363). A motif for mitochondrial prepeptide proteases (Hendrick J. P., Hodges, P.E., Rosenberg, L.E. (1989) *Proc. Natl. Acad. SCI. USA*. **86**, 4056-4060) was also found with the cleavage site between Ser 58 and Thr 59 (Figure 3A). This putative cleavage results in a 12.2 kDa mature protein, which is similar in size to previously reported thioredoxins.

The C-terminal half of the protein contained the active site found in all thioredoxins with the characteristic amino acid sequence, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys. The molecule showed a 35% homology with other mammalian thioredoxins and many of the structural amino acids that are conserved in mammalian thioredoxins, i.e Phe-12, Pro-40, Asp-59, Lys-82, were also conserved in Trx2 (Figure 3B). However, amino acids participating in protein-protein interactions such as Ala-93 and Glu-57 are changed to Ile and Lys, respectively. One major difference between Trx2 and mammalian thioredoxins is the absence of structural cysteines, residues which are present in all mammalian thioredoxins.

Trx2 has higher homology with the *E.coli* thioredoxin than with the known mammalian proteins and a phylogenetic analysis places Trx2 in a different branch of the tree, distant from the mammalian proteins and closer to the prokaryotic and lower eukaryotic ones.

Sequence relatedness is summarized in Figure 4.

### 3. Northern blot and RT-PCR analyses of Trx1 and Trx2 mRNA expression

A rat multiple tissue northern blot with 2 µg/lane of highly pure poly (A) + RNA from different rat tissues (Clontech) was hybridized with two probes, one of 360 bp specific for rat thioredoxin (Trx1) and one of 392 bp specific for Trx2 as described in Spyrou *et al* (1996) *J. Biol Chem* **272**, 2936-2941. Rat Trx1 and Trx2 open reading frame probes were labelled with [<sup>32</sup>P]dCTP by a random priming procedure and hybridized in ExpressHyb solution (Clontech). The Trx1 probe hybridized to an mRNA of 0.6 kb with highest levels in lung, liver and kidney (Figure 5). The Trx2 mRNA was detected as a 1.3 kb band, in

agreement with the size of cDNA (1,276 bp) and it was highly expressed in heart, liver, skeletal muscle and kidney. RT-PCR was used to compare the relative expression of Trx1 and Trx2 in tissues where the expression of these proteins may be very low. (Figure 6). For RT-PCR analysis, male and female rats (6-8 weeks old) were killed by cervical dislocation, tissues were collected and samples were immediately processed for total RNA isolation according to the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform single step extraction protocol (Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) *J. Biol. Chem.* 162, 156-159). The integrity and quality of the purified RNA was controlled by formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis and by measuring the  $A_{260}/A_{280}$  ratio.

For first strand synthesis, total RNA (1µg) was dissolved in 10 µl water, heated to 70°C for 5 min and then chilled on ice. The volume was increased to 20 µl, giving a final concentration of 1 mM each dATP dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM DTT, 5 pmol random hexamers/l (Promega), 1 U RNasin/µl, 200 U Superscript RT (GIBCO-BRL) and the incubation buffer recommended by the supplier. For PCR amplification 1 µl of cDNA (total 20 µl) was subjected to PCR and amplified for 24 cycles by incubation at 94°C for 10 sec, 54°C for 30 sec and 72°C for 60 sec in a PCR9600 thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). The oligonucleotides trx2f1: 5'-AACCTTTATCGTCCAGGATGGAC-3' and trx2r1: 5'-GCTGGGAGTTCTACTAGGTCC-3' were used for the amplification of a 392 bp fragment of the Trx2 mRNA. The oligonucleotides trx1f1: 5'-CCAAAATGGTGAAGCTGATCGAGAG-3' and trx1r1: 5'-TGATTAGGCAACTCCGTAATAGTG-3' were used for the amplification of a 360 bp fragment of the Trx1 mRNA. The oligonucleotides Act 5', CTGGCACCACACCTTCTA and Act 3', GGGCACAGTGTGGGTGAC were used for the amplification of a 238 bp fragment from β-actin mRNA. After agarose gel electrophoresis and blotting to nitrocellulose filters the PCR products were hybridized to <sup>32</sup>P-labelled internal oligonucleotides: trx2r2: 5'-CACCACCTCCCCGTGCTGTTT-GGCTACCATCTTCTCTAACCAGAGGTCC-3' for Trx2, trx1r2: 5'-CTGGAATGTT-GGCGTGCATTTGACTTCACACTCTGAAGCAACATCCTG-3' for Trx1 and actin primer 5'-GATGACCCAGATCATGTTTGA-3'.

Hybridization was performed at 50°C in Expresshyb hybridization solution followed by five 10 min washes in 2xSSC-0.1%SDS at room temperature and finally two 40 min washes in 0.1%SSC-0.1%SDS at 50°C. While Trx1 is found to follow the  $\beta$ -actin expression with higher expression in colon and liver, Trx2 gave a completely different pattern. It was highly expressed in cerebellum, heart, skeletal muscle, kidney, adrenal gland and testis. No cross hybridization between Trx1 and Trx2 was observed.

#### 4. Expression of recombinant thioredoxin2 and subcellular localization

The C-terminal part of the cDNA encoding a part of rat Trx2 (aa 60-166, Trx2) was amplified by PCR from the TA-Trx2 plasmid by using two mutagenic primers that introduce a *Nde*I (trx2p1: 5'-ACCACCAGAGTCCATATGACAACCTTTAACGTC-3') and a *Bam*HI (trx2p2: 5'-CTGGCCGGATCCCTGCTTATCAGCCAATTAGC-3') site at the N-terminus and C-terminus of the polypeptide respectively. The amplified DNA was cloned into the *Nde*I-*Bam*HI sites of the pET-15b expression vector (Novagen) under the control of a T7 promoter, and the resulting plasmid, pET-trx2 was transformed into the *E. coli* strain BL21 (DE3). A single positive colony was inoculated in 1 l of L-broth with 50  $\mu$ g/ml ampicillin and grown at 37°C until OD<sub>600</sub>=0.5. Then, fusion protein expression was induced by addition of 0.5 mM IPTG and growth continued for another 3.5 h. The cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 10 min, the pellet was resuspended in 50 ml of 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl and 1 mM PMSF. Lysozyme was added to a final concentration of 0.5 mg/ml with stirring for 30 min on ice. Subsequently, MgCl<sub>2</sub> (10 mM), MnCl<sub>2</sub> (1mM), DNase I (10  $\mu$ g/ml), and RNase (10  $\mu$ g/ml) were added and the incubation was continued for another 45 min on ice. The cells were disrupted by sonication for 8 min, the supernatant was cleared by centrifugation at 15,000 x g for 30 min and loaded onto a Talon resin column (Clontech) and the protein was eluted with 20 mM imidazole. The size and purity of the eluted protein was determined by SDS-PAGE on a 15% gel. A single band of 15 kD was detected after the Talon chromatography (data not shown).

The inventors next analyzed the subcellular localization of Trx2 using affinity purified polyclonal antibodies obtained from immunized rabbits (Zeneca Research Biochemicals, England). After 6 immunizations, serum from the rabbits was purified by ammonium

sulfate precipitation. Affinity-purified antibodies were prepared using a cyanogen bromide-activated Sepharose 4B column, onto which 0.5 mg of Trx2 had been coupled using the procedure recommended by the manufacturer (Pharmacia). Specificity of the antibodies was tested by western blotting using recombinant Trx2 and total cell extracts. Mitochondrial, peroxisomal and cytosolic fractions were prepared from rat liver as described (Svensson, L.T., Alexson, S.E.H., Hiltunen, J.K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12177-12183). For immunoblotting analysis samples were subjected to 15% SDS-PAGE and the separated proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Super, Amersham). The membranes were blocked with PBS containing 5% dry fat free milk powder and 0.05% Tween 80 and further incubated with affinity purified anti-Trx2 antibodies. Immunodetection was performed with horseradish peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG (Amersham) diluted 1:5000 following the ECL protocol (Amersham) in a hydrogen peroxide catalyzed oxidation of luminol. As shown in Figure 7, Trx2 is only present in mitochondrial fractions as neither cytosolic nor peroxisome enriched fractions displayed any signal. Rat Trx1 did not cross-react with the affinity purified antibodies against Trx2. By densitometric analyses Trx2 content in total cell-free extracts from rat liver was estimated to be around 0.1 µg/mg protein (data not shown). The transient preprotein with the mitochondrial translocation peptide was not detected indicating that the translocation process is very fast. The recombinant Trx2 in lane 1 has a higher molecular weight because the His-tag was not removed by thrombin.

#### 5. Thioredoxin catalyzed insulin reduction

In order to confirm the specificity of the recombinant Trx2, the inventors examined the reduction of insulin, a classical assay in which thioredoxin catalyzes disulfide reduction of insulin with NADPH in the presence of mammalian thioredoxin reductase (TR). They compared the activities of human thioredoxin with the recombinant Trx2. The insulin disulfide reduction assay was essentially performed as described (Holgrem, A., Björnstedt, M. (1995) *Methods Enzymol* **252**, 199-208) with a slight modification to activate Trx1 and Trx2 by reduction. Aliquots of Trx1 and Trx2 were preincubated at 37°C for 20 min with 2 µl of: 50 mM Hepes pH 7.6, 100 µg/ml BSA and 2 mM DTT, in a total volume of 70 µl. Then, 40 µl of a reaction mixture composed of 200 µl Hepes (1M) pH 7.6, 40 µl EDTA (0.2 M), 40 µl NADPH (40 mg/ml) and 500 µl insulin (10 mg/ml) was added. The reaction

started with the addition of 10  $\mu$ l of TR from calf-thymus (3.0 A<sub>412</sub> unit) and incubation continued for 20 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of 6 M guanidine-HCl, 1mM DTNB and the absorbance at 412 nm was measured. Calf-thymus TR and human thioredoxin were kind gifts from Prof. A. Holmgren, Karolinska Institute, Sweden. As shown in Figure 8, when the samples were preincubated with DTT, Trx2 and human Trx were equally good substrates for TR. However, oxidized human Trx showed a decreased capacity to reduce insulin with a pronounced lag phase. The activity of Trx2 was not affected upon oxidation. Although Trx2 is homologous to the prokaryotic thioredoxins it could not function as a substrate for *E.coli* TR (data not shown).

## 6. Isolation of human cDNA

Using polymerase chain reaction, human cDNA encoding Trx2 has been isolated. This is shown in Figure 9. This is 87.4 % homologous to rat Trx2 cDNA.

The predicted amino acid sequence of human Trx2 is shown in Figure 10. This also contains a putative mitochondrial prepeptide protease cleavage site between Ser58 and Leu59.

## 7. Thioredoxin 2 interacting proteins

In order to determine which proteins Trx 2 interacts with, a human liver cDNA library was used to isolate Trx2 interacting proteins with the yeast two hybrid system. Trx2 was cloned into the pGBT9y vector (Clontech), expressing the DNA binding domain of GAL4 transcriptional activator fused with Trx2. The liver cDNA library was cloned into the pGAD10 vector (Clontech) that expresses the cloned cDNA fused with the DNA activation domain of GAL4. These two vectors were co-transformed to the HF7c yeast strain that is auxotrophic to tryptophan and leucine and has histidine as a reporter gene under the control of the upstream activating sequence (UAS) and TATA portion of the GAL1 promoter. The pGBT9 (Clontech) and pGAD10 vectors contain the selection markers for tryptophan and leucine respectively. Upon interaction of Trx2 with the cloned protein in the pGAD10 vector the transcriptional activation of GAL4 is restored leading to expression of histidine thus supporting growth on plates lacking histidine. Approximately



16x10<sup>6</sup> clones were examined and 200 colonies could grow on plates lacking Leu/Trp/His. For further analysis 110 positive (growing) clones were selected.

The proteins isolated were fibrinogen  $\beta$ -chain precursor, plasminogen, vitronectin, PDI,  $\gamma$ -actin, serine hydroxymethyltransferase, NF- $\kappa$ B p65 and two cDNA sequences that code for proteins with no apparent homology to known proteins in a protein sequence data base (Figure 11).

Using a rat brain cDNA library screened in the same way as above, the following clones were isolated: cytochrome c oxidase, rat ribosomal protein S17, c-myc intron binding protein (zinc finger protein), and five cDNA sequences that code for proteins with no apparent homology in the database. The cDNA sequences can be seen in Figure 12.

#### 8. Genomic organisation of Trx2

To locate the number and position of the introns within the *trx2* gene (Figure 13) of the human genome, 2 sets of primers were generated for use in the PCR amplification of the portions of *trx2* gene, the first set comprising a forward primer corresponding to aa1 to aa7 and a reverse primer from aa110 to aa117 and the second set comprising a forward primer from aa88 to aa96 and a reverse primer from downstream of the stop codon. The first set when used for amplification from human genomic DNA gave a product of approximately 4.2kb and the second primer set gave a product of approximately 9kb thereby giving a combined intron total of approx. 13.2 kb. Both these products were cloned into the pGEMT easy vector (Promega) and sequenced. In the first PCT amplification product, only one intron of 4kb was present which was located between aa87 and aa88 of *trx2*. The 9kb PCR amplification had only one intron as well which was located between aa129 and aa130 of *trx2*. Both splice junctions conformed to the GT/AG rule. The *trx2* gene was therefore shown to possess 2 introns.

#### 9. Isolation of human PAC clones and Chromosomal localisation

The human PAC library (No. 704 purchased from the Resource Center/Primary Database of the German Human Genome Project, Berlin), constructed from a human male fibroblast cell line and ligated into pCYPAC-2 (Lehrach *et al.*, (1990); Loannou *et al.*, (1994)), was

screened with the genomic DNA probe H6-2. Trx2 from the human Trx2 gene. The 4.2 kb fragment was labelled with  $^{32}\text{P}$  by random priming and hybridized to the filter bound PAC clones under stringent conditions (45% formamide, 42°C) over night. After hybridization the filters were washed 20 min in 2XSSC, 0.1% SDS and 20 min in 0.1XSSC, 0.1% SDS at room temperature, followed by three 30 min washes in 0.1XSSC, 0.1% SDS at 65°C. Autoradiography (FUJI Medical X-ray) was analyzed after 4 days. One clone of 130kb was found containing the *trx2* gene from which DNA was isolated by Qiagen preparation. To further confirm that the clone is a true positive, a PCR was performed using the primer sets used above which gave the same amplification products.

#### 10. Somatic cell hybrid panel Fluorescence in situ Hybridization (FISH)

In order to identify which human chromosome carried the *trx2* gene, high molecular weight DNA was isolated from somatic hybrid cell lines (hamster/human and mouse/human) retaining individual human chromosomes. PCR amplification was carried out on each chromosome using primers corresponding to the start and stop codon. The expected product size was approx. 130kb. Chromosome 22 was found to be the one containing the *trx2* gene since this was the chromosome that generated the expected product by PCR amplification (Figure 14).

The PAC clone of *trx2* was used as a probe after labelling with biotin-16-dUTP by nick-translation. To obtain more detailed analyses of the localization of the *trx2* gene, slides with human metaphase chromosomes were prepared using standard procedures. The slides were postfixed, RNase treated and denatured as previously described (Pinkel *et al* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83, 2934-2938). The PAC clone for Trx2 was used as a probe after labelling with biotin-16-dUTP by nick-translation. The probe (50ng, 100ng) was pre-annealed with Cot-1 DNA (2.5-3.5 (g) for 30-60 min at 37°C after denaturing in 68°C for 10 min. Hybridization was performed in 50% formamide at 37°C overnight in a moist chamber. The slides were then washed three times for 5 min in 50% formamide, 2XSSC at 42°C and three times in 0.1XSSC at 60°C. After washing, the hybridized probe was coupled to fluorescein-isothiocyanate-avidin D and the fluorescent signal was amplified by three successive treatments with biotinylated anti-avidin antibodies alternated with fluorescein-isothiocyanate-avidin D (Vector Lab). After dehydration, the slides were mounted in glycerol containing

2.3% DABCO (1,4-diazabicyclo- (2,2,2) octane) as antifade, and DAPI (4,6-diamino-2-phenyl-indole) at 0.5(g/ml as counterstain. The signal was visualized using a Zeiss Axioskop fluorescence microscope equipped with a cooled CCD-camera (Photometrics Sensys) controlled by a Power Macintosh Quadra 950 computer. Gray scale images were captured, pseudocolored and merged using the SmartCapture software (Vysis). The hybridisation signal was detected as symmetrical spots on both chromatids of the homologues chromosomes 22 at q131.1.

#### **11. Northern analysis of Trx2 expression**

To detect the presence of *trx2* mRNA molecules within human cell types, a *trx2* cDNA probe labelled with <sup>32</sup>P dUTP was hybridized to a human mRNA master blot (Clontech). After exposing the blot to autoradiography film, densitometric measurements were performed on the dots appearing on the film. The values measured were then corrected with G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). The highest value was set as 100% and the rest were then compared to the set value. The relative values for the various tissue mRNAs blotted can be seen in Fig 15.

#### **12. Submitochondrial localization and immunohistochemical analysis**

To better understand the function of Trx2 in mitochondria and evaluate the interaction of Trx2 with some of the proteins isolated in the two hybrid screening it is necessary to elucidate its submitochondrial localization of Trx2. Using perfused rat kidney and immunohistochemistry in combination with electron microscopy, the inventors showed that *trx2* is located in the inner mitochondrial membrane.

#### **Immunocytochemistry**

For light microscopic immunocytochemistry the rats were anesthetized with pentobarbital and perfused transcardially first with 100ml of saline followed by a mixture of 4% paraformaldehyde and 0.1% picric acid in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS; pH. 7.3) for 4-5 minutes. After perfusion the tissues were excised and further fixed by immersion in the same solution for 60 min. The samples were cryoprotected with 15% sucrose in PBS

before sectioning in the cryostat. Immunocytochemistry was performed using ABC-method. The sections were first incubated with rabbit antiserum against Trx2 (dil. 1:250 in PBS containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100) for 12-24h. After several washes the sections were incubated with biotinylated goat-anti-rabbit (Vector Labs, dil. 1:300) and ABC-complex for 30 min each. Diaminobenzidine was used as a chromogen to visualize the sites expressing Trx2-immunoreactivity. The sections were dehydrated, mounted and examined with Nikon Microphot-FXA microscope.

### Immunoelectron microscopy

For immunoelectron microscopy the anesthetized animals were perfused with a mixture of 4% paraformaldehyde, 0.1% picric acid and 0.2% glutaraldehyde in PBS for 5 min. The tissues were postfixed by immersion for 5-6 h. The tissues were cryoprotected with 50% sucrose and 10% glycerol in PBS for several days. The tissues were rapidly frozen in liquid nitrogen and 50µm frozen sections were cut with the cryostat. The sections were processed free floating. The Trx2 antibody was diluted (1:50) with PBS containing 1% BSA and 0.2% Saponin and the sections were incubated for 4-6 days with the antibody. After several washes the sections were incubated with secondary antibody and ABC-complex for 12 h each. Diaminobenzidine was used as chromogen. Subsequently the section were fixed with 2% glutaraldehyde, 1% osmium tetroxide and 1% uranyl acetate for 30 min each. The tissues were dehydrated with ethanol and embedded in Epon. The samples were processed for electron microscopy and the thin sections were examined in Jeol 1200 electron microscope.

Nitric acid (NO) is a short lived free radical gas with a variety of physiological roles which include S-nitrosylation of proteins *in vivo*. Since Thioredoxin 1 is well known to scavenge free radicals (Schallreuter, K.V., Wood J. M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 630-637) and can reverse the action of NO in AP1 *in vitro*. (Nikitorite *et al* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 109-112), it is therefore possible that trx2 located in mitochondria may have a similar function to trx1, thus reversing the effect of NO on mitochondrial proteins.

### 13. Immunocytochemistry and *in situ* hybridization in different tissues of adult male and female rat

#### **In situ hybridization**

*In situ* hybridization was carried out as described in detail previously (Kononen and Pelto-Huikko, 1997, TIPS online). Two oligonucleotides (nucleotides trx2r2: CACCACCTTCCCGTGCTGTTGGCTACCATCTTCTCTAACCGAGGTCC and trx2r3: GACAACCTCTGTCTTGAAAGTCAGGTCCATCCTGGACGTTAAAGTTGT) specific for rat Trx2 were labeled to a specific activity of  $1 \times 10^9$  cpm/mg at the 3'-end with  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-dATP (NEN, Boston, MA) using terminal deoxynucleotidyltransferase (Amersham). Both probes produced similar results when used separately and were usually used together in the hybridizations to increase the intensity of the signal. Several control probes with similar GC-content and specific activity were used to ascertain the specificity of the hybridizations. Addition of 100 molar excess of the unlabeled probes abolished all hybridization signals. Rats were decapitated and the tissues excised and frozen on dry ice. Cryostat sections (14  $\mu$ m) were sectioned with Micron HM500 cryostat and thawed onto Probe-On glass slides (Fisher Scientific, Philadelphia, PA). The sections were stored at -20°C until use. The sections were incubated in humidified boxes at 42°C for 18h with 5ng/ml of the labeled probe in the hybridization cocktail, washed, dried and covered with Amersham B-max autoradiograph film for 30-60 days. Alternatively the sections were dipped in Kodak NTB2 nuclear track emulsion (Rochester, NY) and exposed for 90 days at 4°C. The sections were examined in a Nikon Microphot-FXA microscope equipped for dark-field and epipolarization microscopy. Finally, the sections were stained with cresyl violet and analyzed under brightfield conditions.

The results of the immunocytochemical and *in situ* hybridization studies are shown below:

#### **Male Genital organs:**

##### **Testis:**

*In situ*: high levels of trx2 mRNA in seminiferous tubules, variation during spermatogenic cycle.

*Immuno:* Strong labelling in Sertoli cells, primary spermatocytes and also some labelling in Leydig cells.

**Epididymis:**

*In situ:* Signal in the epithelium.

*Immuno:* The epithelial cells are clearly labelled.

**Prostate:**

*In situ:* Clear signal in epithelium.

*Immuno:* Most of the epithelial cells labelled.

**Female genital organs:**

*In situ:* Strong signal in ovary. Corpus lutea are strongest, also labelling in follicles and interstitium. Signal in epithelium and muscular layer in uterus.

*Immuno:* Strong labelling in collapsing follicles. Some labelling in corpus luteum. Labelling in Oocytes in primordial follicles. Clear signal in epithelium in uterus and also staining in smooth muscle cells in myometrium.

**Skin**

*Immuno:* Labelling in keratinocytes in the basal epidermis. Labelling in some cells in hair follicles. Labelling in epithelial cells in sweat glands.

**Endocrine organs:**

**Pituitary:** Moderate labelling with immuno in large number of cells, low signal with *in situ*.

**Adrenal gland:** Strong signal with *in situ* in the adrenal cortex, low signal in medulla. Strong labelling in adrenal cortex, especially zona glomerulosa and fasciculata. No staining in chromaffin cells in medulla.

**Alimentary tract:**

**Salivary gland:** Some labelled cells in secretory alveoli.

**Stomach:** Strong labelling in the mucosa, in parietal cells (secrete acid) of gastric glands and in the epithelial cells of the mucosa.

**Duodenum:** Strong labelling in epithelial cells in the mucosa.

**Liver:** Uniform clear signal with *in situ*. Clear labelling in most of the hepatocytes, some are very strongly stained.

**Eye:**

Clear staining in cornea; in epithelium, stromal fibroblasts and endothelium.

**Lens:** Very strong staining in subcapsular epithelium of the lens.

**Retina:** Staining in ganglion neurons and in bipolar neurons (rods and cones negative).

Labelling in pigment epithelium.

**Respiratory tract:**

Staining in several cells at alveolar level. Parasympathetic neurons in local ganglia are immunoreactive.

**Kidney:**

Strong signal with *in situ* in the medulla of kidney (loops of Henle at this area), lower labelling in the papilla (collecting tubules at this area). Labelling also in cortex.

With immuno clear signal in tubules (Loops of Henle) in the medulla, in collecting tubules. Labelling also in glomeruli.

**Immune system:**

Clear signal with in lymph nodes, spleen, thymus and bone marrow. Strong staining in large number of lymphocytes (proliferating cells in germinal centres) in lymph nodes with immuno. Many cells stained both in spleen and in thymus. In bone marrow several celltypes, megacaryocytes are easily identified.

**Brown fat:**

Strong labelling with immuno especially in young animals.

**Bone:**

Labelling in chondrocytes in cartilage. Labelling in cells lining bone. Strong labelling in some cells around developing bone. With *in situ* very strong signal in some cells in developing bone.

**Muscle:**

Labelling in large number of cells in muscles.

**Peripheral nervous system:**

Large number of labelled neurons in sympathetic ganglia, satellite cells (glia) negative. Part of the cells in carotid body (chemoreceptor) are immunoreactive. Motoneurons in spinal cord are labelled. Large number of the sensory neurons labelled, strongest labelling in small neurons (related to pain) and middle-sized neurons.

**Central nervous system:**

Trx2 is mainly localised in special sets of neurons (mitral cells in olfactory bulb, magnocellular neurons in supraoptic nucleus, substantia nigra, Purkinje cells).

**Circulatory system:**

**Heart:** *In situ*: Strong signal both in atrium and in ventricle (in cardiac muscle).

*Immuno*: Strong staining in most of the muscle cells.

**Blood vessels:** Clear staining of the smooth muscle cells and in small blood vessels.

From previous studies is known that smooth muscle cells do not contain any Trx1. Considering the antioxidant function of thioredoxins, the possibility of a correlation of trx2 expression and atherosclerosis is very interesting.

These results demonstrate the prolific nature of the trx2 mRNA and translation product within the tissues of the adult male and female rat.



In particular, the very strong staining in the subcapsular epithelium of the lens of the eye suggests an important role of Trx2 in the protection of the lens caused by active oxygen, since thioredoxin has been shown to protect cells against oxidative stress (Nakamura, H. *et al* (1994). Immunology Letters **42**, 75-80).

Similarly, the high level of expression of Trx2 in neurons suggests an important role for Trx2 in protecting these cells from oxidative damage. For example, the high expression of Trx2 in neurons together with the ability of thioredoxins to scavenge free radicals and regenerate damage proteins suggests Trx2 may have a role in the limitation and/or reversal of neuron damage since a common factor in a variety of neurodegenerative diseases is the production of free radicals.

Trx2 may also play a significant role in the control of pain, since there are a large number of pain-related sensory neurons in the peripheral nervous system which are strongly labelled with the Trx2 antibody.

#### **14. Comparison of Trx2 with known Trx1 proteins**

A Southern hybridization analysis of the human genome suggested several thioredoxin genes, including at least one inactive pseudogene (Tonissen, K. F., Wells, J. R. (1991) Gene **102**, 221-228).

The encoded protein sequence of Trx2 shows an interesting two-domain structure consisting of a N-terminal part of a 60 amino acid region rich in basic amino acids with a theoretical pI of 12.1 and a C-terminal part homologous to thioredoxin with a pI of 4.8. The N-terminal of Trx2 has characteristic properties of a mitochondrial translocation peptide and a proposed protease cleavage site which may give a mature protein of 12.2 kD. In fact, a slightly larger mitochondrial form of Trx, compared to the cytosolic Trx, has been reported to be present in pig heart based on electrophoretic mobility (Bodenstein, J., Follman, H. (1990) Z. Naturforsch **46c**, 270-279). *In vitro* coupled transcription/translation confirmed the presence of the putative open reading frame in the Trx2 clone. The size of the translation products in the SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis was somewhat larger than the calculated sizes (20 kDa versus 18.2 kDa), but this may be

due to the primary characteristic of the protein (eg. charge). Of course, the native protein may still have a different size due to post-translational modification.

Although Trx2 is phylogenetically closer to prokaryotic than mammalian thioredoxin some amino acids conserved in all prokaryotes like Trp-28 are not conserved in Trx2. Also the differences in amino acids involved in protein interaction such as Ala-93 and Glu-57 will probably confer a different specificity for Trx2 compared to Trx1. All previously described mammalian thioredoxins have 2-3 additional cysteine residues to the two located in the active site. These structural or non catalytic cysteine residues can undergo oxidation, a process which leads to inactivation. From the structure of reduced human thioredoxin Cys-72 is located in a loop in proximity to the active site. Xilin et al. (Ren, X. *et al* (1993) *Biochemistry* **32**, 9701-9708) showed that Cys-72 is responsible for dimer formation and subsequent loss of activity. The absence of corresponding structural cysteines in Trx2 confers a resistance to oxidation. This property might have important physiological implications for the role of Trx2.

Mammalian Trx can be found in many different cellular compartments including nucleus, endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane (Martin, H., Dean, M. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun* **175**, 123-128), (Holmgren, A., Luthman, M. (1978) *Biochemistry* **17**, 4071-4077)). Also Trx is differentially regulated and has separate functions including promotion of cell growth to transcription factor activation and radical scavenging activities. Trx2 is highly expressed in tissues such as heart and skeletal muscle where Trx1 protein is not detectable (Fujii, S. *et al* (1991). *Virchows Archiv A, Pathological Anatomy & Histopathology* **419**, 317-326). Reactive oxygen intermediates (ROI), which comprise hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and superoxide anions, are essential compounds of oxidative metabolism (Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990) *Methods Enzymol* **186**, 1-85). An important source of ROI are mitochondria (Turrens, J. F., Boveris, R. (1980). *Biochem. J.* **191**, 421-427). Generally, ROI are regarded as toxic and harmful metabolites and when their formation occurs in an uncontrolled fashion, they may be implicated in several diseases by inducing lipid peroxidation and disruption of structural proteins, enzymes and nucleic acids. Recently, ROI in addition to being cytotoxic, have been reported to function as signal transducers of TNF-induced gene

expression (Schulze, O.K. *et al* (1993) *EMBO. J.* **12**, 3095-3104). Thioredoxin can reduce hydrogen peroxide and scavenge free radicals (23-25). Using affinity purified antibodies against Trx2 the inventors showed that it is localised in the mitochondria and the mature protein has an apparent molecular weight of 13 kD. A mitochondrial localised Trx2, which is more resistant to oxidation than Trx1, may explain its high expression in heart and skeletal muscle, tissues with high metabolic activity, and confer an important regulatory and/or protective function.

## CLAIMS

1. An isolated nucleic acid molecule comprising at least a portion of the nucleic acid sequences shown in Figure 1A or Figure 9.
2. A nucleic acid molecule according to claim 1, wherein the nucleic acid molecule is cDNA.
3. A nucleic acid molecule demonstrating greater than 87.4% homology to a nucleic acid molecule according to claim 1 or 2.
4. An isolated nucleic acid molecule according to any of claims 1 to 3 wherein the isolated nucleic acid molecule is from a mammal.
5. An isolated nucleic acid molecule according to claim 4 wherein the mammal is a rat.
6. An isolated nucleic acid molecule according to claim 4 wherein the mammal is a human.
7. An isolated human nucleic acid molecule obtained using a nucleic acid molecule according to any of claims 1 to 5.
8. A protein or polypeptide encoded by a nucleic acid molecule according to any previous claim.
9. A protein or polypeptide according to claim 8 comprising at least a portion of the amino acid sequence shown in Figure 1A or Figure 10.
10. A composition comprising a protein or polypeptide according to either of claims 8 or 9 wherein the protein or polypeptide has the ability to scavenge free radicals.
11. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 10 wherein the protein or polypeptide has the ability to regenerate damage proteins.

12. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 11 wherein the protein or polypeptide is involved in the control of pain within an organism.
13. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 12 wherein the protein or polypeptide provides protection against oxidative stress induced cytotoxicity and tissue damage.
14. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 13 wherein the protein or polypeptide provides protection against ischaemic damage to organs.
15. A composition comprising a protein or polypeptide according to claim 14 wherein the protein or polypeptide can attenuate ischaemic reperfusion injury.
16. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 15 wherein the protein or polypeptide comprises a protective compound against heart attacks and strokes.
17. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 16 wherein the protein or polypeptide provides protection to retinal cells from damage caused by active oxygen species generated during oxygen stress to the retina.
18. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 17 wherein the protein or polypeptide comprises a radio-protective compound which attenuates the effects of radiation.
19. A composition comprising a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 18 wherein the protein or polypeptide protects neuronal cells from oxidative damage.
20. A protein or polypeptide according to any of claims 8 to 19 wherein the protein or polypeptide can limit or eliminate the side effects of medicinal drugs caused by generation of reactive oxygen species.

21. A mature protein, fragment, homologue or analogue of a protein according to claims 8 to 20 which mature protein, fragment, homologue or analogue is at least functionally similar to Trx2.
22. A mature protein according to claim 21 comprising the amino acid sequence of Figure 1A from Thr 59 to amino acid 166.
23. A mature protein according to claim 21, comprising the amino acid sequence of Figure 10 from Leu 59 to amino acid 166.
24. A plasmid or other vector comprising a nucleic acid molecule according to any one of claims 1 to 7.
25. A host cell containing a plasmid or other vector according to claim 24.
26. A host cell according to claim 25 which is a mammalian, bacterial or insect cell.
27. Antibodies raised against a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 23.
28. A diagnostic probe wherein the probe comprises any portion of the protein or polypeptide according to any of claims 8 to 23.
29. Diagnostic tests, assays or monitoring methods using a protein or polypeptide or any fragments of a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 23.
30. Diagnostic tests, assays or monitoring methods using a probe comprising at least a portion of a nucleic acid molecule according to any of claims 1 to 7.
31. Diagnostic tests, assays or monitoring methods according to either of claims 29 or 30 wherein the tests, assays or monitoring methods comprise microbiological, animal cell, or biodiagnostic tests, assays, and monitoring methods.
32. The production of a protein or polypeptide according to any of claims 8 to 23 by chemical or biological means.

33. An organism engineered to contain or overexpress the protein or polypeptide according to any of claims 8 to 23.
34. An organism engineered to produce Trx2 encoded by a nucleic acid molecule according to any of claims 1 to 7.
35. An organism according to either of claims 33 or 34 wherein the organism is selected from bacteria or yeast.
36. An organism according to either of claims 33 or 34 wherein the organism is selected from rat and human species.
37. A method of treating a subject with ischaemic damage or retinal damage, the method comprising supplying to the subject a pharmaceutical composition comprising a protein or polypeptide according to any one of claims 8 to 23.
38. A method of treating a subject with oxidative stress induced cytotoxicity and tissue damage, the method comprising supplying to the subject a pharmaceutical composition comprising a protein or polypeptide according to any one of claims 8 to 23.
39. A method of controlling pain within a subject, the method comprising supplying to the subject a pharmaceutical composition comprising a protein or polypeptide according to any one of claims 8 to 23.
40. A method of protecting against damage caused by heart attacks and strokes in a subject, the method comprising supplying to the subject a pharmaceutical composition comprising a protein or polypeptide according to any one of claims 8 to 23.

1/18

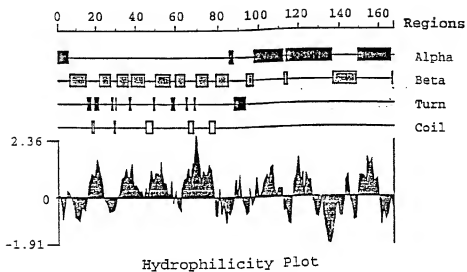
Fig. 1A

TGA CGG GCA GGC CGG CTG GGC TCT GCA TCC CTC TGC TCA CAC TGC CGG  
 \*\*\*  
 GAG ATG GCT CAG CGG CTT CTC CTG AGG AGG TTC CTG ACC TCA GTC ATC  
   M A Q R L L L R R F L T S V I  
 TCC AGG AAG CCT CCT CAG GGT GTG TGG GCT TCC CTC ACC TCT ACG AGC  
   S R K P P Q G V W A S L T S T S  
 CTG CAG ACC CCT CCG TAC AAT GCT GGT CTA ACT GGA ACA CCC AGC  
   L Q T P P Y N A G G L T G T P S  
 CCT GCC CGG ACA TTT CAC ACC ACC AGA GTC TGT TCA ACA ACC TTT AAC  
   P A R T F H T T R V C S T T F N  
 GTC CAG GAT GGA CCT GAC TTT CAA GAC AGA GTT GTC AAC AGT GAG ACA  
   V Q D G P D F Q D R V V N S E T  
 CCA GTT GTC GTG GAC TTT CAT GCA CAG TGG TGT GGC CCC TGC AAG ATC  
   P V V V D F H A Q W C G P C K I  
 CTA GGA CCT CGG TTA GAG AAG ATG GTA GCC AAA CAG CAC GGG AAG GTG  
   L G P R L E K M V A K Q H G K V  
 GTG ATG GCC AAA GTG GAC ATT GAC GAT CAC ACA GAC CTT GCC ATT GAG  
   V M A K V D I D D H T D L A I E  
 TAC GAG GTG TCT GCT GTG CCT ACC GTG CTG GCC ATC AAG AAC GGG GAC  
   Y E V S A V P T V L A I K N G D  
 GTG GTG GAC AAG TTT GTG GGG ATC AAG GAC GAA GAC CAG CTG GAA GCC  
   V V D K F V G I K D E D Q L E A  
 TTC CTG AAG AAG CTA ATT GGC TGA CAAGCAGGGAAGAGGCCAGACTGCCCTTGCC  
   F L K K L I G \*\*\*  
 TGCTGGAACCCATTGCGGGAGGAACCTAGTAGAACTCCAGCCCTCAGCTGTCACTCCTTCGT  
 GCCCTGCCCTGTGTTTGTCTCTGTGGGTCTTGCCCTTTGGGCAGCAGACTTCCAAACCTAGAAG  
 CCACCAGCACTTCAGAGCCAGCCCTCAGCCAGGATGGCCAGGAGAGGGGCAATGCTGCCGATG  
 GTGTGGAGGAGGGGCATCCTGAGCACCTCCTACTGTGTCTCTCTCTGTGCACCTACTGTGTG  
 CTTCTCTTAGGGCTGTGTGCTATTCCCCCTAGATGCTAGACAAAGCCTGGGCCAGCCTGTATTTC  
 ACCGCCCAGGCAATGGCCAGTCCTCTGTCTCTGAGGTCCCTCTGATCTGAAGCCTCAGCCCCAC  
 ACACACACATGTGGCTCTGGGTATTTCCTCTCTGCTCTGTCTGAAAAGGAACAAGAGC  
 TGAACAAGTGAGAGTAATGGATAATTCTCTCATCTTTGTAGTCTGTGAATAAAGAACTTTAT  
 GTGATCCTCTACCTCTGTGTGAAGAACAGAGCCACCCCAATCCCTATCTCTGTGCCCTTC  
 TCTTCTTGTACCTCCCTGGGTAGCTGGGCCTTGGTTCTGTTCCCTGAGCAGGAGGAGGA  
 GCTGTGAACAAGCAGACCAATAAAACCAGGTTGCAATGCCCCAAAAA



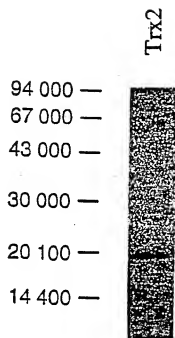
2/18

Fig. 1B



3/18

Fig. 2

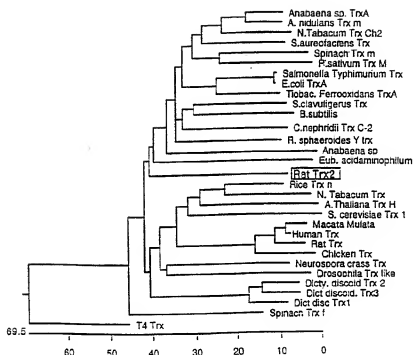


5



5/18

Fig. 4



6/18

Fig. 5



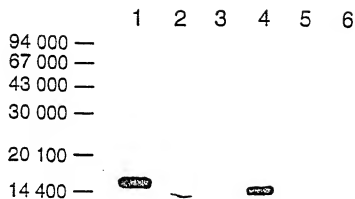
7/18

Fig. 6



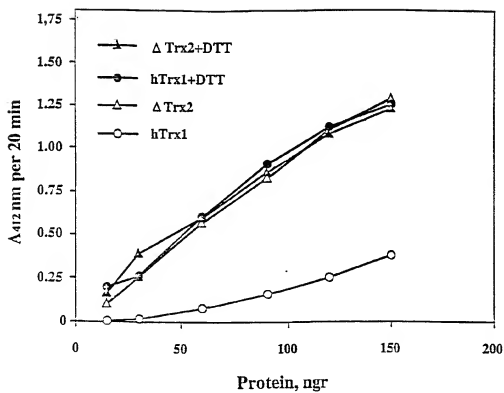
8/18

Fig. 7



9/18

Fig. 8





10/18

Fig. 9

	10	20	30	40	
ATGGCTCAGC	GACTTCTTCT	GAGGAGGTTT	CTGGCCTCTG	40	
TCATCTCCAG	GAAGCCCTCT	CAGGGTCAGT	GGCCACCCCT	80	
CACITCCAAA	GCCCTGCAGA	CCCCACAATG	CAGTCTGGT	120	
GGCCTGACTG	TAACACCCAA	CCAGCCCCGG	ACAATATACA	160	
CCACGAGGAT	CTCCTTGACA	ACCTTTAATA	TCCAGGATGG	200	
	210	220	230	240	
ACCTGACTTT	CAAGACCGAG	TGGTCAACAG	TGAGACACCA	240	
GTGGTTGTGG	ATTTCCACGC	ACAGTGGTGT	GGACCTTGCA	280	
AGATCCTGGG	GCCGAGGTTA	GAGAAGATGG	TGGCTTAGCA	320	
GCACGGGAAG	GTGGTGATGG	CCAAGGTGGA	TATTGATGAC	360	
CACACAGACC	TCGCCATTGA	GTATGAGGTG	TCAGCGGTGC	400	
	410	420	430	440	
CCACTGTGCT	GGCCATGAAG	AATGGGGACG	TGGTGGACAA	440	
GTTTGTGGGC	ATCAAGGATG	AGGATCAGTT	GGAGGCCTTC	480	
CTGAAGAAGC	TGATTGGCTG	A	501		

11/18

Fig. 10

10 20 30 40  
MAQRLLRRF LASVISRKPS QGQWPPLTSK ALQTPQCSPG 40  
GLTYTPNPAR TIYTTRISLT TFNIQDGPDF QDRVVNSETP 80  
VVVDFAQWC GPCKILGPRL EKHVAKOHGK VVMKAVDIDD 120  
HTDLAIEYEV SAVPTVLAMK NGDVVDKFBG IKDEDQLEAF 160  
LKKLIG. 167

12/18

Fig. 11

1.

GGGGCCAAAAAGAGATCTCTGGAGATCCGAAITTCGGATCTTGCCCAAGGCAGGAGAAAGTCAACCGTCTATAACATG  
 GGGATCTGAGGATCTGTGGTGGCTTTTCACAGTTCACCGCTTAAGACATATGTAGATATCACACATTGCGAACCCAA  
 AGGAATCGGGAAGGTGGTGTAGCCAAATGCTGAAAGCAGTGACCATAAAACCTAAGTTCAGCCCTTACAGGAAGCTCAA  
 GGTCTCACAGCTGTTTCTTGGCAACCGGAGGCACAGATTATCAAGCCCTACTTAAACCTGACTTAAGGGAAGGCCCTC  
 TGGGCCCTGACCACACTGGAAGACTTCTGAGGTGTAGAAAGCAGAGGCGCTGTACACTCATTTTAGTTTACCCCAAGT  
 AAGGTCTTCTTCTTCTAGNACCTGCAATCTTTCCACTTGGCTGGGAGCGAGGGGAGGCAAGATCTTTATCAATAC  
 TCCGCTTTNTNAGGANCTTNTTCCATCCATCCAAAAATTTTCTAGCTTTGCGCTACTCCATNCCCAAGANAAT  
 GGTTGGGATGGTTCCTCAATACACCTTNAATCCCAAGCAGCTCTCCAACTTTATCCCATTTGGNCCCAAGGGNT  
 GGTTAGGNTAGGTGAAGAAGCTCCCTTTGGAGGCCAAITGGGCTTGGAAAGTTNGGGAAGAGNCTCCTTANAAITTTTT  
 TTGGNAAGGGGGCANGTTGATATONAAGTTANTTGGAAAAAGGAAGGANTTCC

2.

CAGGGAAAAAGAGACTCTCGAGGATCCGAATTCGGTATAATGACTGAATGAGGCTCTTCAACAGCTGAGTAGCGTGAAC  
 AGGAAATTCANNGGGGNNAAITCTAACATCATTTGTAAGTGTAGTGGTACTATACCATAGATGACTA  
 GAAGAAAAAAGGAAAGGATGAAGAAAAAGTTATTCAGCTGGGTGGGNGCTCATGCTGTAATCCAGCACTTGAG  
 GAGNCAGGCGAGCGACACCCGAGGTGAGGAGTTGAGACCGCTGGCCAAATGTGTAAACCCCTGTCTCCACCAA  
 GATACAAATACAGCTTGGCATGAGGCGAGGTGCTGTATGCCACCGCACTGAGCGAGGCTGAGCGAGGAGAACTCACTTGA  
 ACCCGGAGGGCGGAAGTTTGCAGCGAGCTTCAGTCGANCCTTNCCTCTCAGCGNGCAACAAAGAGTGAATCACT  
 CTCAAAAAANAAGTTATTTCAATGGNATCTCATTTAGCGCANCTTTCCANNNTTAAAAATTTATAAAACTCACT  
 CNGCCACNCGGAAAGAACCAAGNITGGGGTTCTTGATCATCACTCCACTGATGATAATGGNTTCTTCANCCNCACTT  
 CCGAAATCCAGACTTTTATCNNGGTTTNCNANCCCCCANNCTCNCANTTNGNTNGNNAACAACTNATNTCTTTCN  
 ATCTTCANCCCNCGCCNCTNCTCTACTNT

13/18

Fig. 12

1. TCATCTCTCAGTCCCTGCACAGAAATGAGATGAACAAAACGAGACACTTCCACCTGGCCAGAGTCTGGGAGGGGCAGG  
GAGGAACACAGACCTGGACACTTGGTAAGAAAAATAAACCTAAATCAACACATTCAATCTTGACCCCAATAAAGGTTTGAA  
CAGGGAACCTCAGTACACACAGTTCACACCCCTCCCTGGCCAGCACTGAAGAAAACAAAAGTTCAACACACACTAAGGGC  
TTAGGAGGAAGGGGCAATCTCTGGCTTCCCGAACCCGGAAGATGGGCTGGGGAAAAACGGCTATATTTCGCCACCC  
CTTACAGTGTCAACCTACACGAGTTCTGAAATGTGATCCGTAAGATCAGACAGTCAATTTGGCAAGGACAAACCCGCCACCC  
ACCCCAATCACTTACCAACACAGAAAGATTTCCCTTGCACTTCTCCGGAATCTCCCTCATTCACGAGCCCTTTTCCACCTC  
CTCACTCCCAAGAATCATACACACTTCAAACCTGTTCCAGGAACCCCTCCGCCATTAATCTTATCCTCACTGCTCCCACTG  
AAAAACCAACCCCAAAATTCGCCCTGGCCAGATCCAACTCCAGAACNATNGCAGTATGGCCATCCTGTCTGGGTGACCTCC  
CAAAACATTTTONGGGAT
2. AGTTCATAACTCCTGGTCCAGGCACTGTATGCATCGAATAATTTGTCTATGAGCTTCCTAATGACACGACCTTCTCTAGCT  
CCTTGTGAATACTATACTATGCAGATCCCTCAGAAGCATGGACCTGGGACTGGTGGCAACCACTGAGGTGACATTCTCT  
GCCAATGTCCAGCTTGATTTAGATGTCACTGAATCAAGCTGCTTCGCGCCGTGTCTCTGTGAATCTGCTCTTGGCTGGCT  
TTCTCTGGTGTTCGCTGTGCTTGTGCTTTGTGCTTTGGAAGGCTATCCAGAGATATGTAAGCAATCTCTTTAGGAAA  
TAAATTCGTGTTAACCCAAACAAACAACTGCAGCAAAATGGGTTAAAGGCGAANCAGTGGGGCGCTTTGACTAGG  
ACAGATGGCTANGGCTACATGAAGCTGGGAAATCTTTATGAATATGTCAACTTTGTGATCAATGATGTGTGATTAAG  
AATTGNTAAAGGGGAATAATGTCTGTGATACTTATCTGTTTGAAGAGTACTCCAGAACATCTTGATTTAATTAATTAAG  
TTCCATAAATAATCCCCCCTNGCTGTGTTTACNAACTGTTTATCCCCAGTTGGTGCCTTATGTGCCCATTAATAATGTGNTCC  
NCCATGATCNTAGCTNAAATGAAATTT

14/18

3. CTGCTCAGAGCAAGACTGTTACGAAATGACAGGTATCAAGTGCTGGGTAAATATTCATGCACTTTTAATGAACACCCAGG  
 AAAATTTGAGAAATAAGATGAGAGAGAAAACATTTAAATGCCCATAGAGAGCCCTAGCCCTTGATTTTTTAAGAGAT  
 TACCTTGCACTTCGGTGGAAACATAAAATCTCTGTAGAAATGTTTTAATGTGGAAGTTAATATTTACATACGTACAAAT  
 GTGTCGCCCTGAGAAATCTTTGGTACTGTGAGAAATGTAACAGATTTCTTTAAGGGCTCANGTAAAGAGCTGTAGAA  
 AAGTCCAGAAAAGACTGGGTACGATTCAGAGGCTNGGTACCTGATTCANAAAGAGAGGAGAAATTAAGAGGGGAAAA  
 AATTAGTGTNAAATGACAGAAATAGTAAGTCTCAACACACNGACAAATTCGCCACTTGGCGCAGAGAACACGTCATCTTA  
 GTAAATCACAGANAAATGAACCTTNGGGATGTNAAATGACCCCTTGGCTGANGACAGGGTTGAAAAATTCGCCCTCCCATTT  
 CCCTGTTGCACAGAAATACGATGAAATGTTAAGTGAACGTAGGGGCCAGGGTTTGANACAACCCATTCOCATCCTGACCC  
 ACTTTGGCCATATACGTATACC

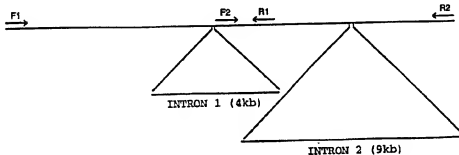
4. CATGTATGTTCAAGTCACATATGCCAAGGCCAAAGAGATGCCCTGTTTGTGCTCTCTACCTTATTCCTTTAGAAAAGG  
 CTGTTCTGCACATGAGGCTGTGCTAGCAGCCAGTTCCCTTCTCTCTACCTAGGGTTACAGGTAGGTAGCCATGGCT  
 ACACCTACTCTTTATGTGAGTGGGATTTCTGGAANAACCTCCCTATGCTTGTGGCTAGCACACTCACCCCACTAAG  
 CAAGCATCTATCTTTGCAGTCAGCATTTTGAATTTCTCTATGAAGCCCTATCAGGAGGGAAGGTGCAATTAATAAAAAA  
 TCTATTATATCTTAGGTTCATTTTGTATCCTACAAATCCAAAGCTATGAATGAACCTTCTTTCTGTTATTCACACAC

5. AAACGGCCGCGGTATCTGACCGTGCAAGGTAGCATAATCACTTGTTCCCTTAATTAGGGAAGTGAATGAATGGCTAAAC  
 GAGGGTTCAACTGCTCTTACTTTCAATCAGTGAAATTTGACCTTCCAGTGAAGAGGCTGGAATCTCCCAATTAAGACGAGA  
 AGACCCCTATGGAGCTTTAAATTTACTAGTTCAACTTATATAAAAAACACCTAATGGGCTAAACAAATAAATAAGAATA  
 AAAAAATTTCCGTTGGGGTGACCTGGGGAATAAAAAATCCTCCGAAATGATTTTAACCTCTAGCTACAAAGTAAATA  
 CTAATATCTTATGACCCAAATTATTGATCAACGGGACCAAGTTACCCCTAGGGATAACAGCGGAATCTCTATTTAAGATTTC

15/18

Fig. 13

ATG GCT CAG CGA CTT CTT CTG AGG AGG TTC CTG GCC TCT GTC ATC TCC AGG AAG  
 1  
 CCC TCT CAG GGT CAG TGG CCA CCC CTC ACT TCC AAA GCC CTG CAG ACC CCA CAA  
 TGC AGT CCT GGT GGC CTG ACT GTA ACA CCC AAC CCA GCC CGG ACA ATA TAC ACC  
 ACG AGG ATC TCC TTG ACA ACC TTT AAT ATC CAG GAT GGA CCT GAC TTT CAA GAC  
 CGA GTG GTC AAC AGT GAG ACA CCA GTG GTT GTG GAT TTC CAC GCA CA: GTGAGTA  
 88  
 TT...INTRON 1 (4kb)...GCCTTTTGAG :G TGG TGT GGA CCC TGC AAG ATC CTG GGG  
 89  
 CCG AGG TTA GAG AAG ATG GTG GCC AAG CAG CAC GGG AAG GTG GTG ATG GCC AAG  
 GTG GAT ATT GAT GAC CAC ACA GAC CTC GCC ATT GAG TAT GAG :GTATGGATTGA...  
 109  
 INTRON 2 (9kb)...TCCACCCAG: GTG TCA GCG GTG CCC ACT GTG CTG GCC ATG AAG  
 110  
 AAT GGG GAC GTG.GTG GAC AAG TTT GTG GGC ATC AAG GAT GAG GAT CAG TTG GAG  
 GCC TTC CTG AAG AAG CTG ATT GGC TGA CAAGCAGGATGAGTCTCTGTTCCCTTGCCCGCGT  
 166 \*

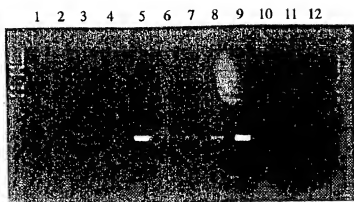


Primer F1: 5'-GATGGCTCAGCGACTTCTTC  
 Primer F2: 5'-GGTGGGTGTGGACCTGCAAGATC  
 Primer R1: 5'-CCACCTTGGCCATCACCACCTTC  
 Primer R2: 5'-GGCAAGGGAACCAAGGACTCATCC

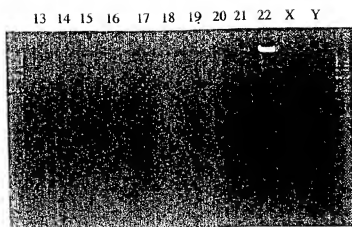
16/18

FIG. 14

chromosome

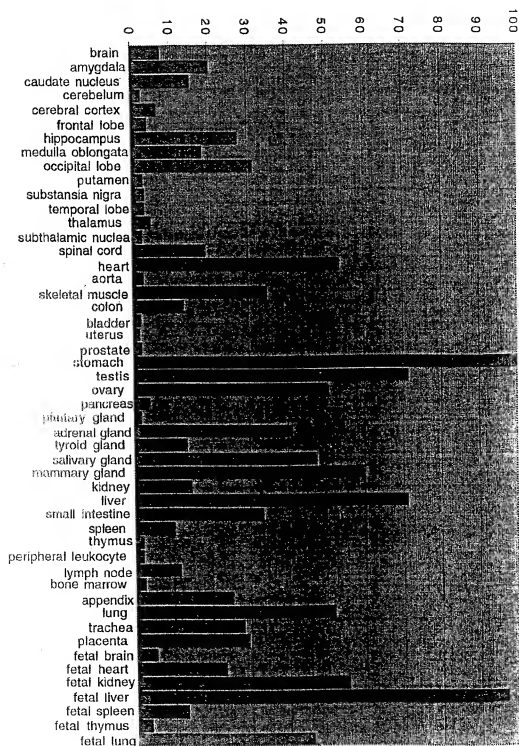


chromosome



17/18

FIG. 15

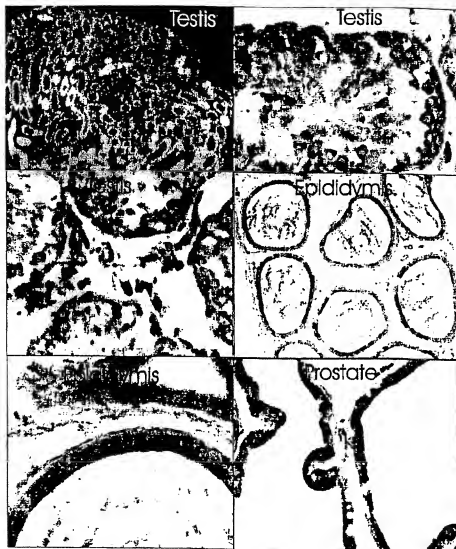


Series2



18/18

Fig. 16



(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-510997

(P2001-510997A)

(43) 公表日 平成13年8月7日(2001.8.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-73-1* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 K 38/00		25/00	
A 6 1 P 9/10		27/02	
25/00		29/00	
27/02		39/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-531760  
 (86) (22) 出願日 平成10年1月28日(1998.1.28)  
 (85) 優先文提出日 平成11年7月28日(1999.7.28)  
 (86) 国際出願番号 P C T / G B 9 8 / 0 0 2 6 3  
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 3 2 8 6 3  
 (87) 国際公開日 平成10年7月30日(1998.7.30)  
 (31) 優先権主張番号 9 7 0 1 7 1 0 . 7  
 (32) 優先日 平成9年1月28日(1997.1.28)  
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)  
 (81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, J P, K R, U S

(71) 出願人 カロ バイオ アクテブラーグ  
 スウェーデン, フディング 57, エスー  
 141, ノヴム  
 (72) 発明者 スパイロウ, ジアニス  
 スウェーデン, フディング 57, エスー  
 141, デパートメント オブ バイオサイ  
 エンシーズ アット ノヴム, カロリンス  
 カ インスティテュート  
 (74) 代理人 弁理士 渡山 勉 (外3名)

(54) 【発明の名称】 哺乳類デオレドキシシ

(57) 【要約】

本発明は、デオレドキシシ及びその使用方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

1. 図1Aまたは図9に示される核酸配列の少なくとも一部を含む、単離された核酸分子。
2. 核酸分子がcDNAである請求の範囲第1項に記載の核酸分子。
3. 請求の範囲第1項または第2項に記載の核酸分子に対して87.4%を超える相同性を示す核酸分子。
4. 哺乳類由来のものである請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項に記載の単離された核酸分子。
5. 哺乳類がラットである請求の範囲第4項に記載の単離された核酸分子。
6. 哺乳類がヒトである請求の範囲第4項に記載の単離された核酸分子。
7. 請求の範囲第1項～第5項のいずれか1項に記載の核酸分子を用いて得られる、単離されたヒト核酸分子。
8. 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の核酸分子によりコードされるタンパク質またはポリペプチド。
9. 図1Aまたは図10に示されるアミノ酸配列の少なくとも一部を含む請求の範囲第8項に記載のタンパク質またはポリペプチド。
10. 請求の範囲第8項または第9項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドはフリーラジカルを捕捉する能力を有するものである組成物。
11. 請求の範囲第8項～第10項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは傷害タンパク質を再生する能力を有するものである組成物。
12. 請求の範囲第8項～第11項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは生物における痛みの制御に関係するものである組成物。
13. 請求の範囲第8項～第12項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、酸化ストレスにより誘導される細胞毒性および組織傷害に対する保護を提供するものである組成物。
14. 請求の範囲第8項～第13項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリ

リペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、器官の虚血性傷害に対する保護を提供するものである組成物。

15. 請求の範囲第14項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、虚血再灌流傷害を減衰できるものである組成物。

16. 請求の範囲第8項～第15項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、心臓発作に対する保護化合物を含むものである組成物。

17. 請求の範囲第8項～第16項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、網膜に対する酸素ストレスの間に生じた活性酸素種により引き起こされる傷害からの網膜細胞の保護を提供するものである組成物。

18. 請求の範囲第8項～第17項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、放射線の作用を減衰する放射線防護化合物を含むものである組成物。

19. 請求の範囲第8項～第18項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含み、前記タンパク質またはポリペプチドは、神経細胞を酸化的傷害から保護するものである組成物。

20. 反応性酸素種の生成により引き起こされる医薬薬剤の副作用を制限または排除できるものである請求の範囲第8項～第19項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチド。

21. 少なくともTrx2と機能的に類似する、請求の範囲第8項～第20項のいずれか1項に記載のタンパク質の成熟タンパク質、フラグメント、ホモログまたはアナログ。

22. 図1AのThr59からアミノ酸166までのアミノ酸配列を含む請求の範囲第21項に記載の成熟タンパク質。

23. 図10のLeu59からアミノ酸166までのアミノ酸配列を含む請求の範囲第21項に記載の成熟タンパク質。

24. 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の核酸分子を含むプラス

ミドまたはその他のベクター。

25. 請求の範囲第24項に記載のプラスミドまたはその他のベクターを含む宿主細胞。

26. 哺乳類、細菌または昆虫の細胞である請求の範囲第25項に記載の宿主細胞。

27. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドに対して生じた抗体。

28. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドの一部を含む診断プローブ。

29. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドまたはタンパク質もしくはポリペプチドのフラグメントを用いる診断試験、アッセイまたはモニター方法。

30. 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の核酸分子の少なくとも一部を含むプローブを用いる診断試験、アッセイまたはモニター方法。

31. 微生物細胞、動物細胞またはバイオ診断試験、バイオアッセイもしくはバイオモニター方法を含む、請求の範囲第30項に記載の診断試験、アッセイまたはモニター方法。

32. 化学的または生物学的な手段による、請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドの生産。

33. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含むまたは過剰発現するように操作された生物。

34. 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載の核酸分子によりコードされるT<sub>r</sub>x2を生産するように操作された生物。

35. 細菌または酵母から選択される、請求の範囲第33項または第34項に記載の生物。

36. ラット及びヒトの種から選択される、請求の範囲第33項または第34項に記載の生物。

37. 虚血性傷害または網膜傷害を有する対象に、請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含む医薬組成物を提供

することを含む、前記対象を治療する方法。

38. 酸化ストレスにより誘導される細胞毒性および組織傷害を有する対象に、請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含む医薬組成物を提供することを含む、前記対象を治療する方法。

39. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含む医薬組成物を対象に提供することを含む、前記対象における痛みを制御する方法。

40. 請求の範囲第8項～第23項のいずれか1項に記載のタンパク質またはポリペプチドを含む医薬組成物を対象に提供することを含む、前記対象における心臓発作による傷害から保護する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 哺乳類チオレドキシン

本発明は、新規の哺乳類チオレドキシンをコードする核酸の単離および特性評価、ならびに、この核酸から産生されるタンパク質またはポリペプチドに関する。

チオレドキシン (Trx) は、多くの原核生物および真核生物に存在することが知られている12-kDaタンパク質であり、すべての生細胞中に遍在すると思われる (Holmgren, A. (1984), *Methods Enzymol.* 107, 295-300; Holmgren, A. (1985), *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237-271)。それは、進化を通して保存されてきた活性部位配列-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-を特徴とする。チオレドキシンの活性部位は、その三次元構造の突出部に位置し (Jeng, M.F. et al., (1994) *Structure* 2, 853-868)、2つのシステイン残基は Trx 依存性還元活性に関与するスルフヒドリル基を提供する。酸化チオレドキシン、 $\text{Trx-S}_2$  は、フラボ酵素であるチオレドキシンレダクターゼ (TR) および NADPH (チオレドキシン系) により  $\text{Trx-SH}_2$  に還元される (Holmgren, A. (1985) 前出)。

いくつかの供給源 (例えば、ラットおよび仔ウシ肝臓、ウサギ骨髄およびヒト胎盤) から単離される哺乳類チオレドキシンは、原核生物のものに対して、ある構造的差異を有する。活性部位システイン残基の他に、(Trx 供給源によって) 2つまたは3つのさらに別の構造的システイン残基が分子のC末端側半分に存在する。これらの残基の酸化は、その酵素活性の損失をもたらす (Ren, X. et al., (1993) *Biochemistry* 32, 9701-9708)。

1つより多いチオレドキシンが、多数の真核生物、例えば酵母に存在する (Muller E.G. (1992) *Yeast* 8, 117-120)。しかしながら、哺乳類細胞からクローニングされているのは、今までのところ1つのチオレドキシン (Trx 1) だけである。

哺乳類チオレドキシンは、リボヌクレオチドレダクターゼ (Thelander, L., Reichard, P. (1979) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 133-158) およびメチオニンシルホキシドレダクターゼ (Holmgren, A. (1985) 前出) のための水素供与体として作用

し、ジスルフィド含有タンパク質の再生(refolding)を促し (Holmgren, A. (1

988), In "Plasma Membrane oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth", "NATO ASI" series, eds, F.L. Crane et al., Plenum Press, New York 295-302)、(Lundstrom, J., Holmgren, A. (1990), J. Biol. Chem. 265, 9114-9120)、そしてグルココルチコイドまたは  $1\text{L}-2$  受容体を活性化する (Grippo, J.F., Holmgren, A., Pratt, W.B. (1985) Biol. Chem. 260, 93-97; Tagaya, et al., (1989) EMB J. 8, 757-764) など広範な種々の生化学的機能に関連している。また、いくつかの転写因子のDNA結合活性を、直接的に (TFIIIC (9)、BZLF1 (10) および NF- $\kappa$ B (11))、またはチオレドキシンにより順次還元される核因子  $\text{Ref-1}$  を介して間接的に (AP-1) 調節することもできる (Abate, C., et al. (1990), Science 249, 1157-1161)。チオレドキシンによる転写因子のレドックス調節の重要性は、Cys 154 / Ser の点突然変異が AP-1 複合体の構成的活性化を引き起こす v-fos 癌遺伝子により例示される (Okuno, H. et al (1993) Oncogene 8, 695-701)。チオレドキシンは、リーダーレスの経路を用いて細胞により分泌され (Ericson, M.L., et al., (1992) Lymphokine & Cytokine Research 11, 201-207; Rubartelli, A., et al., (1992) J. Biol. Chem. 267, 24161-24164; Rubartelli, A., et al., (1995) Cancer Res. 55, 675-680)、リンパ様細胞、繊維芽細胞および種々のヒト固形腫瘍細胞株の増殖を刺激し得る (Wakasugi, N., et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8282-8286; Oblong, J.E., et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 11714-11720; Nakamura, H., et al. (1992) Cancer 69, 2091-2097; Gasdaska, J.R., et al. (1995) Cell Growth & Differentiation 6, 1643-1650)。さらに、 $\text{Trx}$  は初期妊娠因子の必須成分であり (Clarke F.M. et al. (1991) Reproduction & Fertility 93, 525-539)、マクロファージにおける HIV 発現を阻害し (Newman, G. W. et al. (1994) J. Experim. Medicine 180, 359-363)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を還元でき (Spector A et al (1988) J. Biol. Chem. 263, 4984-4990)、フリーラジカルを捕捉 (scavenge) し (Schallreuter K.U., Wood, J.M. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 630-637)、そして酸化ストレスから細胞を保護する (Nakamura



, H. et al. (1994) Immunology Letters 42, 75-80)。

本発明者らは、従来知られている哺乳類チオレドキシンとは機能的および構造的に異なる新規の哺乳類チオレドキシンを同定した。この新規のチオレドキシンは、Trx2とする。

したがって、本発明の第一の要旨では、Trx2遺伝子産物またはTrx2と機能的に類似するポリペプチドをコードする、単離された核酸分子を提供する。好ましくは、核酸分子は、図1Aまたは図9に示された核酸配列を含む。

核酸分子は、cDNAであってもよい。

好ましくは、核酸は、Trx2遺伝子産物またはTrx2と機能的に類似するポリペプチドをコードする図1Aまたは図9の核酸配列に対して少なくとも60%、70%または80%、さらに好ましくは90%の相同性を有する。これは、例えば遺伝子コードの縮重により、Trx2の産生がなお可能な配列の変化を可能にする。

「機能的にTrx2と類似する」という用語は、ポリペプチドが、例えばTrx1と比較して酸化に対して耐性である哺乳類チオレドキシンレダクターゼの存在下でのNADPHによるジスルフィド還元またはインスリンの触媒により示されるような、チオレドキシン活性を有することを意味するものとする。既知のTrx1は、その酵素活性の損失を引き起こすシステイン残基の酸化を示す (Ren X. et al. (1993) Biochemistry 32, 9701-9708)。しカルながらTrx2は、これらのシステイン残基を欠いている。

本発明の第二の要旨では、本発明の第一の要旨による核酸によってコードされるポリペプチド、好ましくは成熟タンパク質を提供する。好ましくは、ポリペプチドは、図1Aまたは図10のアミノ酸配列を含む。

Trx2のアミノ酸配列の分析により、酵素作用によりそれが成熟タンパク質にプロセッシングされ得る、ということが示されている。したがって、本発明は、少なくとも機能的にTrx2に類似する成熟タンパク質、フラグメント、ホモログまたはアナログも提供する。本発明は、そのまま(native)のTrx2と比較して同様の、または好ましくはより良好な機能性を有する組換えまたは合成ポリペ

プチドも包含する。

好ましくは、成熟タンパク質は、図1AのThr59からAsp166までのアミノ酸配列、あるいは図10のLeu59からIle166までの配列を含む。

本発明のさらに別の要旨では、本発明の第一の要旨による核酸を含むプラスミドまたはその他のベクターを提供する。このようなプラスミドまたはその他のベクターは、好ましくは本発明の核酸が挿入され得る当業界で既知の種類の発現ベクターである。

このようなプラスミドまたはベクターは、適切な微生物宿主、例えば大腸菌、または、本発明の核酸配列の発現に関して当業界で既知の種類の適切な細胞、例えば哺乳類または昆虫の細胞中に挿入され得る。したがって、本発明は、本発明のベクターまたはプラスミドを含む細菌、哺乳類または昆虫の細胞を提供する。

チオレドキシン2 (Trx2) は、それが酸化に耐性である点で有利であり、ミトコンドリアに輸送される。ミトコンドリアは、脂質代謝および好気呼吸(酸化的リン酸化)のような生命に関わる細胞機能の部位である。呼吸の場合、二酸素の不完全還元は、反応性酸素中間体すなわちROI (過酸化水素、スーパーオキシドアニオンO<sub>2</sub><sup>-</sup>およびヒドロキシルラジカルOH)の生成を引き起こす。酸化ストレスと呼ばれるROIのレベル増大は、脂質過酸化、タンパク質の不活性化およびDNAにおける鎖切断を引き起こし得る。チオレドキシンは、酸化防止分子として作用しそしてヒドロキシルラジカルを捕捉し、過酸化水素を還元し、そして酸化により不活性化されたタンパク質を再活性化し得る。

したがって、本発明は、酸化ストレス誘発性の細胞毒性および組織傷害に対する保護を含めたTrx2の治療的用途を提供する。特に、Trx2は、虚血性傷害、眼病、放射線および薬物毒性に対して保護するために用い得る。

器官の虚血性傷害の治療に関連して、活性酸素種は、虚血再灌流傷害に関与すると考えられる。多くの心臓発作(heart attacks and strokes)では、虚血期間の後に再灌流期間が来て、その間、酸素ラジカルが生成され、これがおそらくは心臓発作傷害の真の原因であると思われる。Trx2は、虚血性再灌流傷害を減

衰させる保護化合物として用い得る。

眼病の治療に関連して、白内障を含めた多数の目の疾患には、光一酸化性ストレスが関係している。T r x 2 は、網膜に対する酸素ストレス中に生成される活性酸素種により引き起こされる傷害からの網膜細胞の保護のために用い得る。

放射線の治療に関連して、放射線への曝露は、酸素ラジカル酸化の主な供給原

因である。T r x 2 は、放射線の作用を減衰するための放射線防護化合物として用い得る。

最後に、薬物毒性の治療に関連して、いくつかの一般的に用いられる薬剤（例えばアドリアマイシン）は、反応性酸素種の産生により引き起こされる種々の望ましくない副作用を示す。例えば、心臓毒性が傷害の主な形態であるアドリアマイシンの使用に際しては、T r x 2 を用いて副作用を排除し得る。

本発明を、添付の図1～15を参照しながら、例示により説明する。

図1は、ラットT r x 2 のcDNA、推定アミノ酸配列および予測二次構造を示す。A) 一文字コードでの推定アミノ酸配列は、ヌクレオチド配列の下に示されている。活性部位は四角で囲み、可能性のあるポリアデニル化シグナルには下線を付す。B) 二次構造は、DNA S T A R プログラムおよびGarnier-Robsonアルゴリズムを用いて予測された。Kyte-Doolittleアルゴリズムを、T r x 2 アミノ酸配列のハイドロパシープロットに適用した。

図2は、S p 6 R N A ポリメラーゼ、T N T 結合網状赤血球転写翻訳系および<sup>35</sup>[ S ] メチオニンを用いたT r x 2 cDNAのin vitro翻訳を示す。生成物をS D S - P A G E により分析した。

図3は、ラットT r x 2 の予測アミノ酸配列、ならびにヒトおよびラットT r x 1 の予測アミノ酸配列のアラインメントを示す。A) 予測ラットT r x 2 アミノ酸配列のN末端部分の分析。その領域の二次構造予測は、示されたような $\alpha$ -ヘリックスを示唆する。矢印は、2つのプロテアーゼモデルによる切断に関するコンセンサスモチーフによって確定されたような蓋然的ミトコンドリアシグナルペプチドプロテアーゼ切断部位を示す (Hendrick J. P., Hodges, P. E., Rosenberg, L. E. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 4056-4060)。太字は

、位置-10のア르기ニン、位置-8の疎水性残基；位置-5に存在する残基S、GおよびT。B) アラインメントは、大腸菌チオレドキシンの三次元構造を基礎にしている (Eklund, H., Gleason, F.K., Holmgren, A. (1991) Proteins 11, 13-28)。中黒矩形は、ヒトTrx、ラットTrx1およびラットTrx2における保存アミノ酸残基を示す。構造は、アミノ酸配列の下に示すような4つの $\alpha$ -ヘリックス、ゆがめられた3<sub>10</sub>ヘリックスおよび5つの $\beta$ -シートを含有する。

図4は、系統樹を示す。系統樹は、PAM250残基重み表を用いてClustal法により構築された。

図5は、ラット組織におけるTrx1およびTrx2のノーザンブロット分析を示す。各レーンは、2 $\mu$ gのポリ(A)+RNAを含有する。ブロットは、「実験手法」の項に記載されているように、Trx1およびTrx2のプロープとハイブリダイズさせた。分析に用いた組織を上段に示す。mRNAの概算サイズは、Trx1およびTrx2に関してそれぞれ0.6kbおよび1.3kbであった。

図6は、Trx1およびTrx2をコードする転写物のRT-PCR分析を示す。1 $\mu$ gの全RNAを逆転写し、1 $\mu$ lをPCRのための鋳型として、Trx1、Trx2および $\beta$ -アクチンのための特異的プライマーとともに用いた。生成物をアガロースゲル電気泳動により分離し、膜に移して、特異的オリゴヌクレオチドプロープを用いてプロープした。

図7は、細胞画分のイムノブロッティング分析を示す。SDS/PAGEにより細胞画分を分析し、抗Trx2抗体を用いて検出した。レーン1  $\Delta$ -Trx2 (5ng)、レーン2 全ラット肝細胞抽出物 (15 $\mu$ g)、レーン3 サイトゾル画分 (15 $\mu$ g)、レーン4 ミトコンドリア画分 (15 $\mu$ g)、レーン5 ペルオキシソーム画分 (15 $\mu$ g)、レーン6 ヒトTrx1 (5ng)。

図8は、Trx活性の分析を示す。酸化Trx2およびヒトチオレドキシンを、DTTの存在下または非存在下でのインスリンを還元するそれらの能力に関してアッセイした。6M グアニジン-HCl、1mM DTNBの添加により、

20分後に反応を停止させた。

図9は、ヒトTrx2 cDNA配列を示す。

図10は、図9のcDNA配列に基づく予測ヒトTrx2アミノ酸配列を示す。

図11は、Trx2と相互作用するタンパク質をコードする2つのヒト肝臓cDNA配列を示す。

図12は、Trx2と相互作用するタンパク質をコードする5つのラット脳cDNA配列を示す。

図13は、ヒトtrx2遺伝子を示す。

図14は、第22染色体におけるPCR生成物のゲル像を示す。

図15は、RNAマスタープロット(Clontech)を用いて分析したヒトTrx2のmRNAレベルを示す。

#### 1. ラットチオレドキシン2のクローニング

進化を通して保存されるチオレドキシンの活性部位の一次構造(VVVDFSATWCGPCK)を用いて、<sup>32</sup>Pで標識して、新規のチオレドキシン遺伝子に関してラット心臓cDNAライブラリー(Clontech)をスクリーニングするためのプローブとして用いる縮重プライマーを設計した。約1×10<sup>6</sup> プラークをメーカー(Amersham)の指示書にしたがってスクリーニングし、陽性バクテリオファージを単離した。バクテリオファージから挿入物を切り出して、TAベクター(Invitrogen)中でクローン化し、シーケンシングした。前記のクローンの392bp部分を、PCR(94℃で1分、52℃で1分および72℃で1分を30回)により、特異的プライマー(trx2f1:5'-AACCTTTATCGTCCAGGATGGAC-3' および trx2r1:5'-GCTGGGAGTTCTACTAGGTTC-3')を用いて、増幅した。

PCR生成物をランダムプライミングにより<sup>32</sup>P標識し、高ストリンジент条件下で同一ライブラリーを再スクリーニングするために用いた。ハイブリダイゼーションを、60℃でExparesshybハイブリダイゼーション溶液(Clontech)中で実施し、その後2×SSC-0.1%SDS(1×SSCは0.15M NaCl+0.15M クエン酸ナトリウム)中室温での10分間の洗浄を5回、

最後に0.1% SSC-0.1% SDS中で60℃での40分間の洗浄を2回実施した。600,000を超えるクローンをスクリーニングし、5クローンを単離し、TAベクター中でクローン化して、シーケンシングした。クローンはすべて重複しており、最長のもの、即ちTrx2は、ATG開始コドンで始まり、TGA終止コドンで終わる501bpのオープンリーディングフレームを有していた。全長cDNAを得るために、アンカー特異的プライマーおよびTrx2の3'非翻訳領域に相補的なアンチセンスプライマー (trx2r2:5'-GCTGGGAGTCTACTAGGTTCC-3') の存在下で、オリゴヌクレオチドアンカ

ー化心臓cDNA鋳型(Clontech)を用いたネステド(nested)PCRによるcDNA末端の5'迅速増幅(RACE)を、Clontechプロトコールに記載されているように実施した。PCR生成物をTAベクター中でクローン化し、シーケンシングした。Trx2に重複し、ATG開始コドンの上流のインフレームのTGA停止コドンを含めた46bpの新規の5'配列をコードするcDNAフラグメントが増幅された。全体の複合配列は、ポリ(A)テールに対応する20アデノシンの連続およびポリ(A)テールから18bp上流のAATAAAAモチーフを含めた1276bpから成る。オープンリーディングフレームは、18.2kDaの予測質量および7.9のpIを有する166アミノ酸のタンパク質をコードする(図1A、1B)。

Trx2クローン中に存在するオープンリーディングフレームが機能的で、翻訳可能タンパク質をコードすることを確認するために、cDNAをTA-Trx2クローンのSP6プロモーターから転写し、0.5μgを、TNT結合網状赤血球溶解液系(Promega)およびSp6RNAポリメラーゼを用いて、30℃で60分間翻訳し、<sup>35</sup>Sメチオニンを取込ませた。翻訳生成物を15%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、オートラジオグラフィーにより可視化した。結果は20kDの翻訳生成物を示し、このことは翻訳可能な機能的コード配列の存在を示す(図2)。

## 2. 推定アミノ酸配列の分析

タンパク質のN末端領域は正荷電残基を高含量で有し、二次構造予測は、αヘ

リックスに続く $\beta$ シートの可能性を示した(図1B)。

これらの特徴は、ほとんどのミトコンドリアターゲティングシグナルペプチドに共通であり(Neupert, W. (1994), *Clinical Investigator* 72, 251-261)、部分的アミノ酸組成のアルゴリズム分析は、ミトコンドリア細胞内局在化を示した(Newman, G. W. et al. (1994), *J. Experim. Medicine* 180, 359-363)。ミトコンドリアプレペプチドプロテアーゼのモチーフ(Hendrick, J.P., Hodges, P. E., Rosenberg, L.E., (1989)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 4056-4060)は、Ser 58およびThr 59の間の切断部位とともに見出された(図3A)。この推定上の切断は12.2 kDa成熟タンパク質を生じ、これは従来報告され

ているチオレドキシンとサイズが類似している。

タンパク質のC末端側半分は、特徴的アミノ酸配列Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lysを伴う、全チオレドキシンに見出される活性部位を含有した。この分子は他の哺乳類チオレドキシンと35%の相同性を示し、哺乳類チオレドキシン中に保存されている構造アミノ酸の多くが、即ちPhe-12、Pro-40、Asp-59、Lys-82がTrx2中にも保存されていた(図3B)。しかしながら、タンパク質-タンパク質相互作用に関与するアミノ酸、例えばAla-93およびGlu-57は、それぞれIleおよびLysに変わっている。Trx2と哺乳類チオレドキシンとの間の、ある大きな差は、すべての哺乳類チオレドキシン中に存在する残基である構造システインの非存在である。

Trx2は、既知の哺乳類タンパク質とよりも大腸菌チオレドキシンと高度の相同性を有し、系統発生的分析では、Trx2は、哺乳類タンパク質から離れた、そして原核生物および下等真核生物のタンパク質により近い系統樹の異なる枝に置かれる。

配列関連性を図4にまとめる。

3. Trx1およびTrx2のmRNA発現のノーザンブロット分析およびRT-PCR分析

2  $\mu$ g/レーンの、異なるラット組織からの高純度ポリ(A)+RNA (Clontech)を用いたラット多組織ノーザンブロットを、Spyrou et al (1996) J. Biol. Chem. 272, 2936-2941に記載されているようにして、2つのプローブ、即ちラットチオレドキシン (Trx1) に特異的な360bpのプローブと、Trx2 に特異的な392bpのプローブとハイブリダイズさせた。ラットTrx1およびTrx2のオープンリーディングフレームプローブを、ランダムプライミング法により [<sup>32</sup>P] dCTPで標識し、Expresslyb溶液 (Clontech) 中でハイブリダイズさせた。Trx1 プローブは、肺、肝臓および腎臓において最高レベルで、0.6kbのmRNAとハイブリダイズした(図5)。Trx2 mRNAは、cDNA (1,276bp)のサイズと一致して、1.3kbバンドとして検出され、それは心臓、肝臓、骨格筋および腎臓で高度に発現された。RT-PCRを用いて、これらのタンパク質の発現が非常に低い組織中でのTrx1と

Trx2の相対的発現を比較した(図6)。RT-PCR分析のために、雌雄のラット(6~8週齢)を頸部脱臼により屠殺し、組織を採取して、酸性グアニジウムチオシアネートフェノールクロロホルム単一工程抽出プロトコールにしたがって、全RNA単離のために試料を直ちに処理した(Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) J. Biol. Chem. 162, 156-159)。精製RNAの完全性および品質は、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動により、そしてA<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比を測定することにより、制御した。

第1鎖合成のために、全RNA (1  $\mu$ g)を10  $\mu$ lの水に溶解し、70℃で5分間加熱した後、氷上で冷却した。容量を20  $\mu$ lに増大し、最終濃度で、1mM各dATP、dGTP、dCTP、dTTP、10mM DTT、5  $\mu$ mol/Lランダム六量体/1 (Promega)、1U RNAsin/ $\mu$ l、200U Superscript RT (GIBCO-BRL) および供給元推奨のインキュベーション緩衝液とした。PCR増幅のために、1  $\mu$ lのcDNA (総量20  $\mu$ l)をPCRに付し、PCR 9600サーモサイクラー (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) 中で94℃で10秒、54℃で30秒、72℃で60秒のインキュベーションを24回実施して増幅した。Trx2 mRNAの392bpフラグメントの増幅のために、オリゴヌ



クレオチド  $t r x 2 f 1 : 5' - AACCTTATCGTCCAGGATGGAC - 3'$  および  $t r x 2 r 1 : 5' - GCTGGGAGTCTACTAGGTTCC - 3'$  を用いた。  $T r x 1$  mRNA の 360 bp フラグメントの増幅のために、オリゴヌクレオチド  $t r x 1 f 1 : 5' - CCAAAATGGTGAAGCTGATCGAGAG - 3'$  および  $t r x 1 r 1 : 5' - TGATTAGCAAACTCCGTAATAGT - 3'$  を用いた。  $\beta$ -アクチン mRNA からの 238 bp フラグメントの増幅のために、オリゴヌクレオチド  $A c t 5' - CTGGCACCACACCTTCTA$  および  $A c t 3' - GGGCAGAGTGTGGGTGAC$  を用いた。アガロースゲル電気泳動およびニトロセルロースフィルターへのプロットング後、PCR 生成物を、  $T r x 2$  に関しては<sup>32</sup>P 標識内部オリゴヌクレオチド:  $t r x 2 r 2$  :

$5' - CACCACCTTCCCGTCTGTTT - GCCTACCATCTTCTCTAACCAGGTC - 3'$  と、  $T r x 1$  に関しては  $t r x 1 r 2$  :

$5' - CTGGAATGTT - GCGGTGCATITGACTTCACACTCTGAAGCAACATCCTG - 3'$  と、

そしてアクチンプライマー  $5' - GATGACCCAGATCATGTTTGA - 3'$  とハイブリダイズさせた。

ハイブリダイゼーションは、50℃でExpresshybハイブリダイゼーション溶液中で実施し、その後2xSSC-0.1%SDS中室温で10分間の洗浄を5回、最後に0.1%SSC-0.1%SDS中50℃で40分間の洗浄を2回実施した。 $T r x 1$  は  $\beta$ アクチン発現に従って、結腸および肝臓でより高い発現を示すことが判明したが、一方、 $T r x 2$  は完全に異なるパターンを示した。それは、小脳、心臓、骨格筋、腎臓、副腎および精巣で高度に発現された。 $T r x 1$  と  $T r x 2$  との間の交差ハイブリダイゼーションは観察されなかった。

#### 4. 組換えチオレドキシン2の発現および非細胞性局在化

ポリペプチドのそれぞれN末端およびC末端にNdeI ( $t r x 2 p 1 : 5' - ACCACCAGAGTCCATATGACAACCTTTAACGTC - 3'$ ) およびBamHI ( $t r x 2 p 2 : 5' - CTGGCCGATCCCTGCTTATCAGCCAATTAGC - 3'$ ) 部位をそれぞれ導入する2つの突然変異性プライマーを用いて、TA- $T r x 2$  プラスミドからのPCRにより、ラット  $T r x 2$  の一部(アミノ酸60-166、 $T r x 2$ ) をコードするcDNAのC末端部分を増幅した。増幅DNAを、T7プロモーターの制御下のpET-1

5 b発現ベクター(Novagen)のNde I-BamH I 部位中にクローン化し、その結果生じたプラスミドpET-trx2を大腸菌BL21株(DE3)中に形質転換した。単一陽性コロニーを、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含有する1 lのLBロス中に接種し、 $\text{OD}_{600} = 0.5$ になるまで $37^\circ\text{C}$ で増殖させた。次に、 $0.5\text{mM}$  IPTGの添加により融合タンパク質発現を誘発し、増殖をさらに3.5時間継続させた。 $10,000\times\text{g}$ で10分間遠心分離して細胞を収穫し、 $50\text{ml}$ の $20\text{mM}$  Tris-HCl, pH8.0、 $100\text{mM}$  NaClおよび $1\text{mM}$  PMSF中にペレットを再懸濁した。氷上で30分間攪拌しながら、リゾチームを添加して最終濃度を $0.5\text{mg}/\text{ml}$ とした。その後、 $\text{MgCl}_2$  ( $10\text{mM}$ )、 $\text{MnCl}_2$  ( $1\text{mM}$ )、DNase ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )およびRNase ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )を添加して、インキュベーションを氷上でさらに45分間継続した。8分間の音波処理により細胞を破裂させ、 $15,000\times\text{g}$ で30分間の遠心分離により上清を清浄にし、

Talon樹脂カラム(Clontech)上に投入して、 $20\text{mM}$  イミダゾールでタンパク質を溶離した。溶離タンパク質のサイズおよび純度は、 $15\%$ ゲル上でのSDS-PAGEにより確定した。Talonクロマトグラフィー後に、 $15\text{kD}$ の単一バンドが検出された(データは示されていない)。

本発明者らは次に、免疫感作ウサギから得られるアフィニティー精製ポリクローナル抗体(Zeneca Research Biochemicals, England)を用いて、Trx2の細胞下局在性を分析した。6回免疫感作後、ウサギからの血清を硫酸アンモニウム沈殿により精製した。メーカー(Pharmacia)推奨の手法を用いて、 $0.5\text{mg}$ のTrx2がその上に結合された臭化シアン活性化セファロース4Bカラムを用いて、アフィニティー精製抗体を調製した。抗体の特異性は、組換えTrx2および全細胞抽出物を用いてウエスタンブロットにより試験した。ミトコンドリア、ペルオキシソームおよびサイトソルの画分は、前報のようにラット肝臓から調製した(Svensson, L.T., Alexson, S.E.H., Hiltunen, J.K. (1995) J. Biol. Chem. 270, 12177-12183)。イムノブロットング分析のために、試料を $15\%$  SDS-PAGE処理し、分離されたタンパク質を電気泳動によりニトロセルロ

ース膜 (Hybond-C Super, Amersham) に移した。5 %乾燥脂肪無含有粉乳および 0.05 % Tween 80 を含有する PBS で膜をブロッキングし、アフィニティー精製抗 Trx 2 抗体とともにさらにインキュベートした。ルミノールの過酸化水素触媒性酸化における ECL プロトコール (Amersham) にしたがって 1 : 5000 に希釈した西洋ワサibelオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (Amersham) を用いて、免疫検出を実施した。図7に示したように、サイトゾルまたはペルオキシソームが豊富な画分はいかなるシグナルも示さなかったため、Trx 2 はミトコンドリア画分中だけに存在する。ラット Trx 1 は、Trx 2 に対するアフィニティー精製抗体と交差反応しなかった。密度測定分析により、ラット肝臓からの全細胞無含有抽出物中の Trx 2 含量は、約 0.1  $\mu\text{g}$  / タンパク質 1 mg と概算された (データは示されていない)。ミトコンドリア輸送ペプチドを有する一過性プレタンパク質は検出されず、このことは輸送(translocation)工程が非常に迅速であることを示す。レーン1の組換え Trx 2 は、His タグがトロンピンにより除去されなかったため、より高い分子量を有

する。

#### 5. チオレドキシン触媒性インスリン還元

組換え Trx 2 の特異性を確認するために、本発明者らは、インスリンの還元を試験したが、これは、チオレドキシンが哺乳類チオレドキシンレダクターゼ (TR) の存在下で NADPH によりインスリンのジスルフィド還元を触媒する古典的アッセイである。ヒトチオレドキシンと組換え Trx 2 の活性を比較した。インスリンジスルフィド還元アッセイは、本質的には既報通り (Holgrem, A., Björnstedt, M. (1995) Methods Enzymol. 252, 199-208) に実施したが、但し、わずかな修正を加えて、還元により Trx 1 および Trx 2 を活性化した。Trx 1 および Trx 2 のアリコートは、50 mM の HEPES, pH 7.6、100  $\mu\text{g}$  / ml の BSA および 2 mM の DTT (2  $\mu\text{l}$ ) とともに、総容量 70  $\mu\text{l}$  で、37 °C で 20 分間、予備インキュベートした。次に、200  $\mu\text{l}$  の HEPES (1 M)、pH 7.6、40  $\mu\text{l}$  の EDTA (0.2 M)、40  $\mu\text{l}$  の NADPH (40 mg / ml) および 500  $\mu\text{l}$  のインスリン (10 mg / ml) からなる反応

混合物の $40\mu\text{l}$ を添加した。 $10\mu\text{l}$ の仔ウシ胸腺由来TR (3.0A<sub>412</sub> 単位)を添加して反応を開始させ、インキュベーションを $37^{\circ}\text{C}$ で20分間継続した。 $0.5\text{ml}$ の6Mグアニジン-HCl、1mMのDTNBの添加により、反応を停止させ、 $412\text{nm}$ での吸光度を測定した。仔ウシ胸腺TRおよびヒトチオレドキシンは、A. Holmgren教授 (Karolinska Institute, Sweden) の御厚意により入手したものであった。図8に示すように、試料をDTTとともに予備インキュベートした場合、Trx2およびヒトTrxはTRに対して等しく良好な基質であった。しかしながら、酸化ヒトTrxは、インスリンを還元する能力の低減を示し、顕著なラグ期を有した。Trx2の活性は、酸化に影響されなかった。Trx2は原核生物チオレドキシンと同様であるけれども、それは大腸菌TRの基質としては機能できなかった (データは示されていない)。

#### 6. ヒトcDNAの単離

ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、Trx2をコードするヒトcDNAが単離された。これは、図9に示される。これは、ラットTrx2 cDNAと87.4%相同性である。

ヒトTrx2の予測アミノ酸配列を図10に示す。これも、Ser58およびLeu59の間に推定上のミトコンドリアプレペプチドプロテアーゼ切断部位を有する。

#### 7. チオレドキシン2相互作用タンパク質

Trx2と相互作用するタンパク質を確定するために、ヒト肝臓cDNAライブラリーを用いて、酵母の2つのハイブリッド系により、Trx2相互作用タンパク質を単離した。pGBT9ベクター (Clontech) 中にTrx2をクローン化した。これはTrx2と融合したGAL4転写アクチベータのDNA結合ドメインを発現する。pGAD10ベクター (Clontech) 中に肝臓cDNAライブラリーをクローン化した。これはGAL4のDNA活性化ドメインと融合したクローン化cDNAを発現する。トリプトファンおよびロイシンに対して栄養要求性で、上流活性化配列 (UAS) およびGAL1プロモーターのTATA部分の制御下でレポーター遺伝子としてヒスチジンを有するHF7c酵母株をこれら2つ

のベクターで同時形質転換した。pGBT9 (Clontech) およびpGAD10ベクターは、それぞれトリプトファンおよびロイシンに関する選択マーカーを含有する。pGAD10ベクター中のクローン化タンパク質とTrx2との相互作用により、GAL4の転写活性化が回復されて、ヒスチジンの発現をもたらした。したがってヒスチジンを欠いたプレート上での増殖を支持する。約 $1.6 \times 10^6$ クローンを検査し、200コロニーがLeu<sup>+</sup>/Trp<sup>+</sup>/His<sup>+</sup>を欠いたプレート上で増殖し得た。さらに分析するために、110の陽性(増殖)クローンを選択した。

単離されたタンパク質は、フィブリノーゲンβ鎖前駆体、プラスミノゲン、ビトロネクチン、PDI、γ-アクリン、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、NF-κB p65、およびタンパク質配列データベース中の既知のタンパク質と明らかな相同性を示さないタンパク質をコードする2つのcDNAであった(図11)。

前記と同様の方法でスクリーニングされたラット脳cDNAライブラリーを用いて、以下のクローンを単離した。チトクロームcオキシダーゼ、ラットリボソームタンパク質S17、c-mycイントロン結合タンパク質(ジンクフィンガ

ータンパク質)、およびデータベース中で明らかな相同性を有さないタンパク質をコードする5つのcDNA配列。cDNA配列は、図12に示す。

#### 8. Trx2のゲノム構成

ヒトゲノムのtrx2遺伝子(図13)内のイントロンの数および位置をつきとめるために、2組のプライマーを生成して、trx2遺伝子の部分のPCR増幅に用いた。1組目は、アミノ酸1～アミノ酸7に対応するフォワードプライマーとアミノ酸110～アミノ酸117のリバースプライマーとから成り、2組目は、アミノ酸88～アミノ酸96のフォワードプライマーと、停止コドン下流のリバースプライマーとから成る。第一組は、ヒトゲノムDNAからの増幅に用いると、約4.2 kbの生成物を生じ、第二プライマー組は約9 kbの生成物を生じ、それにより計約13.2 kbの併合イントロンが生じる。これらの生成物とともにpGEMTイージーベクター(Promega)中にクローン化して、シーケン

シングした。第一のPCT増幅生成物では、trx2のアミノ酸87とアミノ酸88との間に位置する4kbのイントロンが1つだけ存在した。9kbPCR増幅は同様に、trx2のアミノ酸129とアミノ酸130との間に位置するイントロンを1つだけ有した。両方のスプライス部位はGT/AGルールに合致した。したがって、trx2遺伝子は2つのイントロンを保有することが示された。

#### 9. ヒトPACクロンの単離および染色体局在性

ヒト男性繊維芽細胞株から構築され、pCYPAC-2 (Lehrach et al., (1990); Ioannou et al., (1994)) に結合されたヒトPACライブラリー (No. 704, Resource Center/Primary Database of German Human Genome Project, Berlinから購入) を、ヒトTrx2遺伝子からのゲノムDNAプローブH6-2 Trx2を用いてスクリーニングした。4.2kbフラグメントを、ランダムプライミングにより<sup>32</sup>Pを用いて標識し、ストリンジェント条件(45%ホルムアミド、42℃)下で一晩、フィルター結合PACクロンとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを2XSSC, 0.1%SDS中で20分間、0.1XSSC, 0.1%SDS中で20分間、室温で洗浄後、0.1XSSC, 0.1%SDS中で65℃で30分の洗浄を3回実施した。4日後に、オートラジオグラフィー (FUJI Medical X線) で分析した。130kbのクロー

ンはtrx2遺伝子を含有することが判明し、これからQiagen調製品によりDNAが単離された。クロンが本当に陽性であることをさらに確認するために、前記で用いたプライマー組を用いてPCRを実施し、その結果、同一増幅生成物を得た。

#### 10. 体細胞ハイブリッドパネル蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)

trx2遺伝子を保有するヒト染色体を同定するために、個々のヒト染色体を保有する体細胞ハイブリッド細胞株 (ハムスター/ヒトおよびマウス/ヒト) から高分子DNAを単離した。開始および停止コドンに対応するプライマーを用いて、各染色体で、PCR増幅を実施した。予測生成物サイズは、約130kbで

あった。第22染色体は、PCR増幅により予測生成物を生じた染色体であったため、*trx2* 遺伝子を含有する染色体であることが判明した(図14)。

ニックトランスレーションによりビオチン-16-dUTPで標識後、プローブとして*trx2*のPACクローンをを用いた。*trx2* 遺伝子の局在性のさらに詳細な分析を得るために、標準手法を用いてヒト中期染色体のスライドを調製した。既報のようにスライドを後染色し、RNアーゼ処理して、変性させた(Pinkel et al., (1986)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934-2938)。 *Trx2* のPACクローンは、ニックトランスレーションによりビオチン-16-dUTPで標識後、プローブとして用いた。68℃で10分間の変性後に、プローブ(50 ng, 100 ng)をCot-1 DNA (2.5~3.5 g)を用いて、37℃で30~60分間、予備アニリングした。ハイブリダイゼーションは、湿润チャンバーにおいて37℃で一晩、50%ホルムアミド中で実施した。次にスライドを50%ホルムアミド、2XSSC中42℃で5分間の洗浄を3回、0.1XSSC中60℃での洗浄を3回行った。洗浄後、ハイブリダイズしたプローブをフルオレセイン-イソチオシアネート-アビジンDと結合させて、ビオチン化抗アビジン抗体とフルオレセイン-イソチオシアネート-アビジンD (Vceter Lab) とによる交互の3連続処理により、蛍光シグナルを増幅させた。脱水後、褪色防止剤としての2.3%DABCO (1, 4-ジアザビスクロ- (2, 2) オクタン)、および対比染色としての0.5 g/mlのDAPI

(4, 6-ジアミノ-2-フェニルーインドール)を含有するグリセロール中にスライドをマウントした。Power Macintosh Quadra 950コンピュータにより制御される冷却CCDカメラ (Photometrics Sensys) を装備したZeiss Axioskop 蛍光顕微鏡を用いて、信号を可視化した。SmartCaptureソフトウェア (Vysis) を用いて、グレースケール画像を取得し、擬似彩色して、マージさせた。ハイブリダイゼーション信号は、q13.1.1での相同第22染色体の両方の染色糸上の対称的スポットとして検出された。

#### 11. *Trx2* 発現のノーザン分析

ヒト細胞型での*trx2* mRNA分子の存在を検出するために、<sup>32</sup>P dU

TPで標識した  $\text{trx2}$  cDNAプローブをヒトmRNAマスタープロット (Clontech) とハイブリダイズさせた。プロットをオートラジオグラフィフィルムに曝露後、フィルム上に現れた点に関して密度測定を実施した。次に、測定した値を、G3PDH (グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ) を用いて補正した。最高値を100%と設定して、残りを設定値と比較した。プロットされた種々の組織mRNAに関する相対値を図15に示す。

## 12. ミトコンドリア内局在性および免疫組織化学的分析

ミトコンドリアにおける  $\text{Trx2}$  の機能をよりよく理解し、2つのハイブリッドスクリーニングで単離されたタンパク質のいくつかとの  $\text{Trx2}$  の相互作用を評価するためには、 $\text{Trx2}$  のそのミトコンドリア内局在性を解明する必要がある。灌流ラット腎臓および電子顕微鏡と組合せた免疫組織化学を用いて、本発明者らは、 $\text{trx2}$  がミトコンドリア内膜に局在することを示した。

### 免疫細胞化学

光学顕微鏡的免疫細胞化学分析のために、ラットにペントバルビタール麻酔を施して、先ず100mlの食塩水を、その後0.1Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH7.3) 中の4%パラホルムアルデヒド及び0.1%ピクリン酸の混合物を用いて、経心臓的に4~5分間灌流した。灌流後、組織を切り出して、同一溶液に60分間浸漬してさらに固定した。切片作製前に、クリオスタット内で、PBS中の1%スクロースで試料をクリオプロテクトした。ABC法を用いて、免疫細胞化学的分析を実施した。切片を先ず、 $\text{Trx2}$  に対するウサギ抗血清

(1%BSAおよび0.3%Triton X-100を含有するPBSで1:250に希釈) と12~24時間インキュベートした。数回洗浄後、切片をビオチニル化ヤギ抗ウサギ (Vector Labs, 1:300希釈) およびABC-複合体と、各々30分間インキュベートした。ジアミノベンジジンを色原体として用いて、 $\text{Trx2}$  -免疫応答を発現する部位を可視化した。切片を脱水し、封入して、ニコンMicrophot-FXA顕微鏡で観察した。

### 免疫電子顕微鏡



免疫電子顕微鏡用に、PBS中の4%パラホルムアルデヒド、0.1%ピクリン酸および0.2%グルタルアルデヒドの混合物を用いて、5分間、麻酔動物を灌流した。5～6時間液浸により、組織を後固定した。PBS中の50%スクロースおよび10%グリセロールを用いて数日間、組織をクリオプロテクトした。液体窒素中で組織を急速凍結させて、50  $\mu$ mの凍結切片をクリオスタットで切断した。切片を処理して自由浮遊させた。Trx2抗体を、1%BSAおよび0.2%サポニンを含有するPBSで希釈(1:50)し、切片を抗体とともに4～6日間インキュベートした。数回洗浄後、切片を二次抗体およびABC複合体と各々12時間インキュベートした。ジアミノベンチジンを色原体として用いた。その後、切片を2%グルタルアルデヒド、1%四酸化オスミウムおよび1%酢酸ウラニルで各々30分間固定した。組織をエタノールで脱水し、エポンに包埋した。試料を電子顕微鏡用に処理して、薄切片をJeol 1200電子顕微鏡で観察した。

硝酸(NO)は、in vivoでのタンパク質のS-ニトロシル化を含む種々の生理学的役割を有する短命なフリーラジカルガスである。チオレドキシン1はフリーラジカルを捕捉し(Schallreuter, K.V., Wood, J.M. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 630-637)、そしてin vitroでのAP1におけるNOの作用を逆転し得る(Nikitorite et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 109-112)ことが周知であるため、ミトコンドリア内に位置するtrx2はtrx1と同様の機能を有し、したがってミトコンドリアタンパク質に及ぼすNOの作用を逆転し得る可能性がある。

13. 成熟雄および雌ラットの異なる組織における免疫細胞化学およびin situハイブリダイゼーション

#### in situハイブリダイゼーション

以前に詳細に説明されている(Kononen and Peltö-Huikko, 1997, TIPSオンライン)ように、in situ/、ハイブリダイゼーションを実施した。ラットTrx2に特異的な2つのオリゴヌクレオチド(ヌクレオチドtrx2r2: CACCACCTTCCC GTGCTGTTTGGCTACCATCTTCTCTAACCAGGTCC、およびt r x

2 r 3 :

GACAACCTCTGCTCTTGAAAGTCAGGTCCATCCTGCAGCTTAAAGCTTGT) を、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (Amersham) を用いて、<sup>32</sup>P-dATP (NEN, Boston, MA) により、3' 末端で、 $1 \times 10^9$  cpm/mg の比活性に標識した。両プローブは、別々に用いられた場合に類似の結果を生じ、通常はハイブリダイゼーションにおいて一緒に用いられて、シグナルの強度を増大した。同様のCG含量および比活性を有するいくつかの対照プローブを用いて、ハイブリダイゼーションの特異性を確認した。100モル過剰量の非標識化プローブを添加すると、ハイブリダイゼーションシグナルはすべて消失する。ラットを断頭し、組織を切り出して、ドライアイス上で凍結させた。クリオスタット切片 (14 μm) を Micron HM500 クリオスタットで切断し、Probc-On ガラススライド (Fisher Scientific, Philadelphia, PA) 上で解凍した。使用まで、切片を -20℃ で保存した。切片を加湿箱中で、42℃ で 18 時間、ハイブリダイゼーションカクテル中の 5 ng/ml の標識化プローブとインキュベートし、洗浄して、乾燥し、Amersham B-max オートラジオグラフィフィルムで 30~60 日間被覆した。あるいは、切片を Kodak NTB2 スクレアートラックエマルション (Rochester, NY) 中に浸し、4℃ で 90 日間曝露させた。暗視野およびエピボラリゼーション顕微鏡法用に装備された Nikon Microphot-FXA 顕微鏡で、切片を観察した。最後に、切片をクレシルバイオレットで染色して、明視野条件下で分析した。

免疫細胞化学および in situ ハイブリダイゼーション試験の結果を以下に示す。

雄生殖器：

精巣：

in situ：精細管中に高レベルの *trx2* mRNA。精子形成周期中の変化。

免疫：セルトリ細胞、第一精母細胞で強標識化。ライディヒ細胞でも多少の

標識化。

精巣上体：

in situ：上皮にシグナル。

免疫：上皮細胞が明らかに標識される。

前立腺：

in situ：上皮に明瞭なシグナル。

免疫：上皮細胞のほとんどが標識化。

女性生殖器：

in situ：卵巣に高度のシグナル。黄体が最も強く、卵胞および間質(interstitium)も標識化。子宮の上皮および筋層にシグナル。

免疫：崩壊(collapsing)中の卵胞で強度の標識化。黄体に多少の標識化。原始卵胞の卵母細胞に標識化。子宮上皮に明瞭なシグナル、そして子宮筋層の平滑筋に染色。

皮膚：

免疫：基底(basal)上皮のケラチノサイトに標識化。毛胞のいくつかの細胞に標識化。汗腺の上皮細胞に標識化。

内分泌器官：

下垂体：多数の細胞において免疫に関する中等度の標識化。in situでは低シグナル。

副腎：副腎皮質にin situで強度のシグナル。髄質では低シグナル。副腎皮質、特に球状帯および束状帯に強度の標識化。髄質中のクロム親和性細胞に染色は認められず。

栄養路：

唾液腺：分泌腺胞にいくつかの標識化細胞。

胃：粘膜、胃腺の壁細胞(酸分泌)、および粘膜上皮に強度の標識化。

十二指腸：粘膜の上皮細胞に強度の標識化。

肝臓：in situに関して均一明瞭なシグナル。肝細胞のほとんどに明瞭な標識化。いくつかは非常に強く染色。

眼：

角膜に明瞭な染色。上皮、支質繊維芽細胞および内皮細胞に染色。

レンズ：レンズの被膜下上皮に非常に強い染色。

網膜：神経節ニューロンおよび双極性ニューロンに染色（杆および円錐細胞は陰性）。色素上皮に標識化。

呼吸路：

肺胞レベルのいくつかの細胞で染色。局所性神経節の副交感神経ニューロンは免疫応答性。

腎臓：

腎臓髓質（この領域のヘンレ係蹄）でin situに強度のシグナル。腎乳頭（この領域の集合管）に低標識化。皮質も標識化。免疫に関しては、髓質の尿細管（ヘンレ係蹄）、集合管に明瞭なシグナル。糸球体も標識化。

免疫系：

リンパ節、脾臓、胸腺および骨髓に関しては、明瞭なシグナル。免疫に関しては、リンパ節の多数のリンパ球（胚中心で増殖中の細胞）に強度の染色。脾臓および胸腺で、多数の細胞が染色。骨髓では、いくつかの細胞型、巨核球が容易に同定される。

褐色脂肪：

免疫に関して、若い動物で特に強く標識化。

骨：

軟骨の軟骨細胞で標識化。骨ライニング細胞で標識化。発達中の骨の周囲のいくつかの細胞に強度の標識化。in situに関しては、発達中の骨のいくつかの細胞で非常に強度のシグナル。

筋肉：

筋肉の多数の細胞に標識化。

末梢神経系：

交感神経神経節に多数の標識化ニューロン。サテライト細胞（グリア）は陰性。頸動脈小体（化学受容体）の細胞の一部は免疫応答性。脊髄の運動ニューロンは標識化。多数の感覚ニューロンが標識化。小型（疼痛に関連）および中型ニューロンで最も強く標識化。

中枢神経系：

T r x 2 は主に特定の組のニューロンに局在する（嗅球の僧帽状細胞、視索上核の大型細胞ニューロン、黒質、プルキンエ細胞）。

循環系：

心臓：in situ：心房および心室（心筋）に強度のシグナル。

免疫：筋細胞のほとんどで強度染色。

血管：平滑筋細胞および小血管の明瞭な染色。

平滑筋細胞がいかなる T r x 1 も含有しないことは、従来の研究から分かっている。チオレドキシンの酸化防止機能を考えると、t r x 2 発現と動脈硬化とが相関する可能性は非常に興味深い。

これらの結果は、成熟雄および雌ラットの組織内の t r x 2 m R N A および翻訳生成物の多産性を実証する。

特に、チオレドキシンは酸化ストレスに対して細胞を保護することが示されている（Nakamura, H. et al. (1994) Immunology Letters 42, 75-80）ために、眼のレンズの被膜下上皮における非常に強度の染色は、活性酸素によって引き起こされるレンズの保護における T r x 2 の重要な役割を示唆する。

同様に、ニューロンにおける T r x 2 の高レベルの発現は、これらの細胞を酸化的傷害から防護する T r x 2 の重要な役割を示唆する。種々のニューロン変性疾患における共通因子がフリーラジカルの産生であるために、例えば、ニューロンにおける T r x 2 の高発現は、フリーラジカルを捕捉し、傷害タンパク質を再生するチオレドキシンの能力とともに、T r x 2 がニューロン傷害の制限および／または逆転においてある役割を有し得ることを示唆する。

T r x 2 抗体で強度に標識される末梢神経系には多数の疼痛関連感覚ニューロンが存在するため、T r x 2 は、疼痛の制御においても有意の役割を果たし得る。

#### 1 4. T r x 2 と既知の T r x 1 タンパク質との比較

ヒトゲノムのサザンハイブリダイゼーション分析は、少なくとも1つの不活性偽遺伝子を含めいくつかのチオレドキシンの遺伝子を示唆した（Tonissen, K.F., Wells, J.R. (1991) Gene 102, 221-228）。

Trx2のコード化タンパク質配列は、12.1の理論的pIを有する塩基性アミノ酸が豊富な60アミノ酸領域のN末端部分と、4.8のpIを有するチオレドキシンと相同のC末端部分とから成る興味深い2ドメイン構造を示す。Trx2のN末端は、ミトコンドリア輸送ペプチドと、12.2kDの成熟タンパク質を生じ得る提案されたプロテアーゼ切断部位という特性を有する。実際、サイトゾルTrxと比較して、わずかに大きいミトコンドリア形態のTrxは、電気泳動処理の移動度に基づいて、ブタ心臓中に存在することが報告されている (Bodenstein, J., Follman, H. (1990) *Z. Naturforsch* 46c, 270-279)。in vitro 結合転写/翻訳は、Trx2クローンにおける推定上のオープンリーディングフレームの存在を確認した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析における翻訳生成物のサイズは、算出サイズより多少大きい(20kD対18.2kD)が、しかしこれは、タンパク質の一次特性(例えば電荷)に拠ると考えられる。もちろん、本来(native)のタンパク質は、翻訳後修飾のために、従来通り異なるサイズを有し得る。

Trx2は系統発生的には哺乳類チオレドキシンより原核生物のチオレドキシンに近いけれども、Trp-28のような全原核生物に保存されるいくつかのアミノ酸は、Trx2中には保存されていない。Ala-93およびGlu-57のようなタンパク質相互作用に関与するアミノ酸の差は、おそらく、Trx1と比較した場合、Trx2に対して異なる特異性を付与すると思われる。従来報告のある哺乳類チオレドキシンはすべて、活性部位に位置する2つに加えてさらに2~3つのシステイン残基を有する。これらの構造性または非触媒性システイン残基は酸化を受け、その過程により不活性化がもたらされる。還元型ヒトチオレドキシンの構造から、Cys-72は、活性部位に極めて近接したループ中に位置する。Xilin等 (Ren, X. et al. (1993) *Biochemistry* 32, 9701-9708) は、Cys-72が二量体形成とその後の活性の損失に関与することを示した。Trx2における対応する構造性システインの非存在は、酸化に対する耐性を付与する。この特性は、Trx2の役割に関して重要な生理学的意味を有し得る。

哺乳類Trxは、核、滑面小胞体、ミトコンドリアおよび形質膜を含めた多数の異なる細胞コンパートメント中に見出される (Martin, H., Dean, M. (1991))

Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 123-128) (Hlogrem, A., Luthman, M. (1978) Biochemistry 17, 4071-4077)。T r x は差別的に調節され、転写因子活性化に対する細胞増殖の促進およびラジカル捕捉活性を含めた別個の機能を有する。T r x 2 は、T r x 1 タンパク質が検出されない組織、例えば心臓および骨格筋中で高度に発現される (Fujii, S. et al. (1991) Virchows Archiv A, Pathological Anatomy & Histopathology 419, 317-326)。過酸化水素、ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドアニオンなどの反応性酸素中間体 (R O I) は、酸化代謝の必須化合物である (Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990) Methods Enzymol. 186, 1-85)。R O I の重要な供給源はミトコンドリアである (Turrens, J.F., Boveris, R. (1980), Biochem. J. 191, 421-427)。一般に、R O I は有毒且つ有害な代謝物質であると見なされ、非制御様式でそれらの生成が起きますと、それらは、脂質過酸化、ならびに構造的タンパク質、酵素および核酸の破壊を誘発することにより、いくつかの疾患に関与し得る。近年、R O I は、細胞傷害性であるほかに、T N F 誘発性遺伝子発現のシグナルトランスデューサーとして機能することが報告された (Schulze, O.K. et al. (1993) EMB 0. J. 12, 3095-3104)。チオレドキシンは過酸化水素を還元し、フリーラジカルを捕捉し得る (23-25)。T r x 2 に対するアフィニティー精製抗体を用いて、本発明者らは、それがミトコンドリア中に局在し、成熟タンパク質は 13 k D という見かけの分子量を有する、ということを示した。T r x 1 よりも酸化に対してより耐性であるミトコンドリア局在化 T r x 2 は、代謝活性が高い組織である心臓および骨格筋におけるその高発現を説明し得、また、重要な調節および／または保護機能を付与し得る。

## 配列表

## (i) 一般情報

## (i) 出願人 :

(A) 名称 : カロ バイオ アクテブラーグ

(B) 通り : ノヴム

(C) 市 : フディング

(E) 国 : スウェーデン

(F) 郵便番号(ZIP) : S-141 57

(A) 氏名 : デーン, ジョン ポール

(B) 通り : ウィザース アンド ロジャース, フォー ダイヤース  
ビルディング, ホルボーン

(C) 市 : ロンドン

(E) 国 : 英国

(F) 郵便番号(ZIP) : EC1N 2JT

(A) 氏名 : スパイロウ, ジアニス

(B) 通り : カロリンスカ インスティテュート, デパートメント  
オブ バイオサイエンス アット ノヴム

(C) 市 : フディング

(E) 国 : スウェーデン

(F) 郵便番号(ZIP) : S-141 57

(ii) 発明の名称 : 哺乳類チオレドキシ

(iii) 配列数 : 48

(iv) コンピュータ読取り可能形式

(A) 媒体 : フロッピーディスク

(B) コンピュータ : IBM PC コンパティブル

(C) 操作システム : PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア : Patentin Release #1.0, Version #1.25(EPC)

(vi) 現行出願データ

(A) 出願番号 : PCT/GB88/00263

(vii) 先出願データ

(A) 出願番号 : GB 9701710.7

(B) 出願日 : 1997年1月28日



## (2) 配列番号1の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 6 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号1 :

```

Trp Cys Gly Pro Cys Lys
 1             5

```

## (2) 配列番号2の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 1276 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ix) 配列の特徴 :

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置 : 52...552

(xi) 配列 : 配列番号2 :

```

ATGCGGCGAG GCGGCTGGG CTCGCAATCC CTCGCTCAC ACTGCCGGA G ATG GCT      57
                                     Met Ala
                                     1

CAG CGG CTT CTC CTG AGG AGG TTC CTG ACC TCA GTC ATC TCC AGG AAG      105
Gln Arg Leu Leu Leu Arg Arg Phe Leu Thr Ser Val Ile Ser Arg Lys
      5             10             15

CCT CCT CAG GGT GTG TGG GCT TCC CTC ACC TCT ACG AGC CTG CAG ACC      153
Pro Pro Gln Gly Val Trp Ala Ser Leu Thr Ser Thr Ser Leu Gln Thr
      20             25             30

CCT CCG TAC AAT GCT GGT GGT CTA ACT GGA ACA CCC AGC CCT GCC CGG      201
Pro Pro Tyr Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gly Thr Pro Ser Pro Ala Arg
      35             40             45             50

```

ACA TTT CAC ACC ACC AGA GTC TGT TCA ACA ACC TTT AAC GTC CAG GAT	249
Thr Phe His Thr Thr Arg Val Cys Ser Thr Thr Phe Asn Val Gln Asp	
55 60 65	
GGA CCT GAC TTT CAA GAC AGA GTT GTC AAC AGT GAG ACA CCA GTT GTC	297
Gly Pro Asp Phe Gln Asp Arg Val Val Asn Ser Glu Thr Pro Val Val	
70 75 80	
GTG GAC TTT CAT GCA CAG TGG TGT GGC CCC TGC AAG ATC CTA GGA CCT	345
Val Asp Phe His Ala Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys Ile Leu Gly Pro	
85 90 95	
CGG TTA GAG AAG ATG GTA GCC AAA CAG CAC GGG AAG GTG GTG ATG GCC	393
Arg Leu Glu Lys Met Val Ala Lys Gln His Gly Lys Val Val Met Ala	
100 105 110	
AAA GTG GAC ATT GAC GAT CAC ACA GAC CTT GCC ATT GAG TAC GAG GTG	441
Lys Val Asp Ile Asp Asp His Thr Asp Leu Ala Ile Glu Tyr Glu Val	
115 120 125 130	
TCT GCT GTG CCT ACC GTG CTG GCC ATC AAG AAC GGG GAC GTG GTG GAC	489
Ser Ala Val Pro Thr Val Leu Ala Ile Lys Asn Gly Asp Val Val Asp	
135 140 145	
AAG TTT GTG GGG ATC AAG GAC GAA GAC CAG CTG GAA GCC TTC CTG AAG	537
Lys Phe Val Gly Ile Lys Asp Glu Asp Gln Leu Glu Ala Phe Leu Lys	
150 155 160	
AAG CTA ATT GGC TGACAGCAG GGAAGAGGCC AGACTGCCCT TGCTGTCTGG	589
Lys Leu Ile Gly	
165	
AAACCCATT GGGGAGGAAC CTAGTAGAAC TCCAGCCCT CAGCTGTGAT CCTGTGTGCC	649
CTGCCCCCTGT TTTGTCTTG TGGGTCTTGC CTTTGGGAG CAGACTTCCA AACCTAGAAG	709
CCACAGCAG TTCAGAGCCA GCCCTCAGCC AGGATGAGCA GGAGAGGGGG ATGCTCTGCC	769
ATGGTGTTGA GGAGGGGCAT CCTGAGCACC TCCTACTGTG TGCTTCTCCT GTGACCTTAC	829
TGTGTGCTTC TTCTAGGGCT TGTGTCTATT CCCCTAGATG CTAGACAAAG CCTGGGGCCAG	889
CCCTGATTCA CCGCCCCAGC AATGGCCAG TCCTGTCTTC TGAGGTCTTC TGATCTGAAG	949
CCTCAGCCCC ACACACACAC ATGTGACTCT GGTGTATTTC CTCTCTCTGC TTCTGCTTAA	1009

```

AAGGAACCA AAGCTGAAC AAGTGAGCT AATGGATAAT TGTCTCATCT TTGTAGCTC 1049
TGTAATAAAG AACTTTATGT GATCCTTCTA CCTCTTGCTG TGAAGAACAG AGCCCAACCC 1129
ATTCCCTATC TGTGTCCCTT CTCTTCTTG TCACTCCCTT GGGTAGCTG GGCCTTGGTT 1139
CTGTTCCCTT GAGCAGGAGG AGGAGCTGTG AACAAACAGA CCAATAAAC CAGGTTTSCA 1249
TTGCCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1276

```

## (2) 配列番号3の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 136 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : タンパク質

## (xi) 配列 : 配列番号3 :

```

Met Ala Gln Arg Leu Leu Leu Arg Arg Phe Leu Thr Ser Val Ile Ser
  1              5              10              15

Arg Lys Pro Pro Gln Gly Val Trp Ala Ser Leu Thr Ser Thr Ser Leu
    20              25              30

Gln Thr Pro Pro Tyr Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gly Thr Pro Ser Pro
    35              40              45

Ala Arg Thr Phe His Thr Thr Arg Val Cys Ser Thr Thr Phe Asn Val
    50              55              60

Gln Asp Gly Pro Asp Phe Gln Asp Arg Val Val Asn Ser Glu Thr Pro
    65              70              75              80

Val Val Val Asp Phe His Ala Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys Ile Leu
    85              90              95

Gly Pro Arg Leu Glu Lys Met Val Ala Lys Gln His Gly Lys Val Val
   100              105              110

Met Ala Lys Val Asp Ile Asp Asp His Thr Asp Leu Ala Ile Glu Tyr
   115              120              125

```

Glu Val Ser Ala Val Pro Thr Val Leu Ala Ile Lys Asn Gly Asp Val  
 130 135 140  
 Val Asp Lys Phe Val Gly Ile Lys Asp Glu Asp Gln Leu Glu Ala Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Lys Leu Ile Gly  
 165

## (2) 配列番号4の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 501 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列 : 配列番号4 :

ATGGCTCAGC GACTTCTCTT GAGGAGGTTC CTGGCCTCTG TCATCTCCAG GAAGCCTCT 60  
 CAGGGTCAGT GGCCACCCCT CACTTCGAAA GGCCTGCAGA CCCCAGATG CAGTCTCTGT 120  
 GGCCTGACTG TACACCCCAA CCCAGCCCGG ACAATATACA CCACAGGAT CTCCTTGACA 180  
 ACCTTTAATA TCCAGGATGG ACCTGACTTT CAAGACCGAG TGCTCACAG TGAGACACCA 240  
 GTGTTGTGGT ATTTCACGC ACAGTGTGT GGACCTGCA AGAATCTGGG GCCAGGTGA 300  
 GAGAAGATGG TGGCCAAAGCA GCACGGCAAG GTGCTGATGG CCAAGGTGGA TATTGATGAC 360  
 CACACAGACC TCACCATGA GTATGAGTG TCAGCGGTGC CCACCTGCTT GGCCATGAAG 420  
 AATGGGACG TGTGTGACAA GTTGTGGGC ATCAAGGATG AGGATCAGTT GGAGCCCTTC 480  
 CTGAAGAAAGC TGATTGGCTG A 501

## (2) 配列番号5の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 166 amino acids  
 (B) 配列の型 : アミノ酸  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

```

Met Ala Gln Arg Leu Leu Leu Arg Arg Phe Leu Ala Ser Val Ile Ser
 1              5              10              15

Arg Lys Pro Ser Gln Gly Glu Trp Pro Pro Leu Thr Ser Lys Ala Leu
      20              25              30

Gln Thr Pro Gln Cys Ser Pro Gly Gly Leu Thr Val Thr Pro Asn Pro
      35              40              45

Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Thr Arg Ile Ser Leu Thr Thr Phe Asn Ile
      50              55              60

Gln Asp Gly Pro Asp Phe Gln Asp Arg Val Val Asn Ser Glu Thr Pro
      65              70              75              80

Val Val Val Asp Phe His Ala Gln Trp Cys Gly Pro Cys Lys Ile Leu
      85              90              95

Gly Pro Arg Leu Glu Lys Met Val Ala Lys Gln His Cys Lys Val Val
      100             105             110

Met Ala Lys Val Asp Ile Asp Asp His Thr Asp Leu Ala Ile Glu Tyr
      115             120             125

Glu Val Ser Ala Val Pro Thr Val Leu Ala Met Lys Asn Gly Asp Val
      130             135             140

Val Asp Lys Phe Val Gly Ile Lys Asp Glu Asp Gln Leu Glu Ala Phe
      145             150             155             160

Leu Lys Lys Leu Ile Gly
      165

```

(2) 配列番号 6 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 62 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号6 :

```

Met Ala Gln Arg Leu Leu Leu Arg Arg Phe Leu Thr Ser Val Ile Ser
1           5           10           15

Arg Lys Pro Pro Gln Gly Val Trp Ala Ser Leu Thr Ser Thr Ser Leu
                20           25           30

Gln Thr Pro Pro Tyr Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gly Thr Pro Ser Pro
35           40           45

Ala Arg Thr Phe His Thr Thr Arg Val Cys Ser Thr Thr Phe
50           55           60

```

(2) 配列番号7の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号7 :

```

Arg Xaa Phe Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号8の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号8 :

```

Arg Xaa Leu Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号9の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 9 :

```

Arg Xaa Val Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号 10 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 10 :

```

Arg Xaa Ile Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号 11 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 11 :

```

Arg Xaa Phe Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号 12 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 12 :

```

Arg Xaa Leu Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

## (2) 配列番号13の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号13 :

```

Arg Xaa Val Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1             5                      10

```

## (2) 配列番号14の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号14 :

```

Arg Xaa Ile Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
 1             5                      10

```

## (2) 配列番号15の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号15 :

```

Arg Xaa Phe Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
 1             5                      10

```

## (2) 配列番号16の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状



(xi) 配列 : 配列番号16 :

```

Arg Xaa Leu Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号17の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号17 :

```

Arg Xaa Val Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号18の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 10 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号18 :

```

Arg Xaa Ile Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Xaa
1           5           10

```

(2) 配列番号19の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 107 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号19 :

```

Thr Thr Phe Asn Val Gln Asp Gly Pro Asp Phe Gln Asp Arg Val Val
1           5           10           15

```

```

Asn Ser Glu Thr Pro Val Val Val Asp Phe His Ala Glu Trp Cys Gly
      20                      25                      30

Pro Cys Lys Ile Leu Gly Pro Arg Leu Glu Lys Met Val Ala Lys Gln
      35                      40                      45

His Gly Lys Val Val Met Ala Lys Val Asp Ile Asp Asp His Thr Asp
      50                      55                      60

Leu Ala Ile Glu Tyr Glu Val Ser Ala Val Pro Thr Val Leu Ala Ile
      65                      70                      75                      80

Lys Asn Gly Asp Val Val Asp Lys Phe Val Gly Ile Lys Asp Glu Asp
      85                      90                      95

Gln Leu Glu Ala Phe Leu Lys Lys Leu Ile Gly
      100                      105

```

## (2) 配列番号20の配列の情報：

## (i) 配列の性質：

(A) 配列の長さ：105 amino acids

(B) 配列の型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

## (ii) 配列：配列番号20：

```

Met Val Lys Leu Ile Glu Ser Lys Glu Ala Phe Gln Glu Ala Leu Ala
  1                      5                      10                      15

Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
      20                      25                      30

Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Cys Asp Lys
      35                      40                      45

Tyr Ser Asn Val Val Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
      50                      55                      60

Val Ala Ala Asp Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Tyr
      65                      70                      75                      80

Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
      85                      90                      95

```

Leu Glu Ala Thr Ile Thr Glu Phe Ala  
100 105

## (2) 配列番号21の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 105 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号21 :

Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp  
1 5 10 15  
Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys  
20 25 30  
Gly Pro Cys Lys Met Ile Asn Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys  
35 40 45  
Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp  
50 55 60  
Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Thr Pro Thr Phe Gln Phe Phe  
65 70 75 80  
Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys  
85 90 95  
Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val  
100 105

## (2) 配列番号22の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 774 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号22 :

GGGCCCAAAA AAAGAGATCT CTCGAGGATC CGAATTCGGG ATCTGGGCA AGGCAGGAGG	60
AAGTCACCCG TCATAACATG GGGATTCTGA GGATCTGTGG TGGGCTTTTC ACAGTTCCAC	120
CCTCTAAGAC ATATGTAGAT ATCACACAAT GCGRACCAA AGGAAGTGGG AAGGTGTGT	180
AGCCAAATGC TGAAGCAGT GACCATARA AACTAAGTTC AGCCCTTACA GGAATCRAA	240
GGCTTCACAG CTGTTTCCTG GCAACCGGAG GCACAGATTA ATCAAGAGCC TCACTCTAA	300
CCTGACTAAG GGAAGGCCCTC TGGGCCCTGA CCACACCTGG AAGACTTCTC AGGTTTAGAA	360
AGCAGAGAGG CCTGTACACT CATTTTAGTT TACCCCAAGT AAGTCTTGC TTNCTTTAG	420
NACCCTGCAA TTCCTTTCCA CTGCGCTTGG GGACGGAGGG GNCAGATCT TTATCAATAC	480
TCCCCTTTNN TNAAGGANTC TTNTTCAATN CCATCCAAA AATTTTITA CTGATTGGC	540
TATCCATNC CAAGAAATT GGTGGGATG GTTCCCTCA ATACCACCTN NAATTCGAAN	600
GCCATGTCTC TCCACTTTA TTCCATTGGG NCCAGGGNT GGTAGGNTA GGTAAAGRAA	660
GCTCCCTTGG GAGGCCAAT GGGGCTTGA AGGTNGGGA AAGNCTCCTT ANAATTTT	720
TTGGGAAAGG GGGCANGTTC ATATCNAAGT TANTTGGAAA AGGAAGCANT NTCC	774

## (2) 配列番号 2.3 の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 750 base pairs
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列 : 配列番号 2.3 :

CAGGCAAAAG AGACTCTCGA GGATCCGAAT TCCGTATAAA TGACTGAATG AGGCTCTTCA	60
ACAGCTGAGT AGCGTGAAGT AGGAAAATIN CANNGGGGNN AATTTAACA TCATTGTGTA	120
ACTAGATTGT TTAGATGGGT ACTAATCCAT AGTATGACTA GAAGGAABAA AGGAAGGAT	180

GAAAGAAAG TTATTTCAGC TGGGTGCGGN GGCTCATGCC TGTATCCCA GCATTTGAG	240
GGGTCGAGGC AGGCGAGCCA CCCGAGGTCA GGAGTCTGAG ACCAGCTGG CCANTATGGT	260
GAAACCTCTT CTCCACCAAA GATACAAAA TCAGCTGGGC ATGGAGGCAG GTCCCTGTAA	280
TGCCAGCCAC TCAGGAGGCT GAGGCGGAG AATCACTTGA ACCCGGAGG CGGAAGTGC	300
AGCGAGCTTC AGATCGANCC ACTTCCCTC CAGGCGGCA AACAGAGTG AARACTCCAT	320
CTCAAAAAA ARAAGTATT TCAATGGAT CTCACTTGC GCAACCTTC AMNTANNTA	340
AAAATTATT AAAAATCACT CACCAACNG GGAAGAAGAC AAGNTTGGG TTCTGTATCA	360
TCACTCCACT GATGATAATT GGTCTCTCA NCCNCACTT CCCGAATCA GACTTTTTAT	380
CNNGGCTTNT CNAACCCCC AMNTGCTNC AMTTGAGTN GNAACAATN ATNTCTTCN	400
ATCTTCANCC CNGGCCNCTN CTCTACTNT	420

## (2) 配列番号24の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 857 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

## (ii) 配列 : 配列番号24 :

TCATCTCTCA GTCCCTGCAC AGAATGAGA GATGAACAA AACGAGACAC TTCCACCTGG	50
CCAGAGTCTG GGAGGGCAGG GAGGAACACA GACCTGGACA TTGTRAGAA AATTAAPACC	120
TAAATCAAC ATTCAATCTT GTACCAATA AAGGTTTGA CAGGGAATC AGTCAACACC	190
AGTTCACACC CTCCCTTGCC AGCACTGAAG AAAAAAATA GTTCAACACA CACTTAGGGC	260
TTAGGAGGAA GCGCATCTCT CTTGCTTCC CCCAACCCC AAGAATGGC TGGGGAATA	330
ACGGCTATAT TTCCCCACCC GTTACAGTGT CAACCTTACA CGAGTTCIGA ATGIGATCG	400
TAAATTCAG CAGCTCAATT GCAAGGACA ACCCCACC ACCCAATCA CTTCAACCAAC	470

AGAAAGATT TCGTTGCAC TTCTCTCCG AATCTCTCA TTCGCGCT TTCCACCTC	480
CTCACTCCCA GAAGTCATTA CACACTCAA ACTGTCCAA GGAACCCCTC CCCCATTTCT	540
TCTATCTTCA CTTCCTACTN AAAACCAACC NCCAAATTGC CCTGCCCCG ATCCACTCC	600
AGAACNATNG CAGTATGGCC ATCTGTCTG GGTGACCTCC CAAACATTT CNGGGAT	660

## (2) 配列番号 25 の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 666 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号 25 :

AGTTCATAAT CCTGTCCCG GCACGTATG CATCGAATAI ATTGTCTCAT GAGCTTCCTA	60
ATGACACGAC CTTCCTAGCT CCTTGTGAAT ACTATACTAT GCAGATCCCT CAGAAGCATG	120
GCACCTGGGA CTGGTGCAC CCACTGAGGT GACATTCTCT GCCAATGTCA GCCTGATTTA	180
GATGTCACTG AATCAAGCTG CTTCGCCCC' GTGTCTCTGT GAATCTGCTC TTGGCTGGCT	240
TTCTCTGCTG_TTGCCTGCTT GCTTGCCTGC TTGTTGCTT TGGAGGCTA TCCAGATAT	300
GTAGCAATT CTTAGGAAA TAAATGCTG TTAAACCAAA CAACCAAAA CACTGCAGAC	360
GAATGGGTT AAAGCCGAN CAGTGGGGC GTTGACTAGG ACAGATGGCT ANGCTCTACA	420
TGAAGTGGG AAATTCCTTA TGAAATATGT CAATTTGTG ATCAATGAT GTTGATATAA	480
AATGTNIPA AGGGAATAAI TGCTGATAC TTATCTGTTT GAAAGTACT CCAGRANCAI	540
CTTGATTTAA TTAITTAAG TTCTTAAAT ATCCCCCCTT NGCTGTTAC NAACTGTTT	600
ATCCCCGTT GGTGCTTAT GTCCCCATTA AATGTNTCC NCCATGATN TACCTNBAAT	660
GAATTT	666

## (2) 配列番号26の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 662 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

## (xi) 配列 : 配列番号26 :

```

CTGCTCAGAG CAGAACTCT TACGAAATGA CAGGTATCAA GTCTGGGTA ATACTCATCC      60
ATTTTAATTG AACACCCAGG AATTITGAGA AATTAAGATG AGAAGAGAAA ACTTTAATAA      120
TGCCCCAAG AGAAGCCCTA GCCTTGATT TTTAAGAGAT TACCTTGCA TCGGTGGAA      180
ACATAAAANT CTCTGTTAGA ATGTTTAAAT GTGGAAGTTA ATATTACAT ACTTACAATT      240
GTGTCTCCCT GAGAAATCT TTGTTACTGT CAGAAATAGT AACCGATTG TTTRAGGGCT      300
CANGTAAGA AGCTGTAGTA AAGTCCGAA AAGACTGGGT ACGATTGAG GGTGTTGAC      360
CTGATTCAAA AAGAGAGGGA NAGATTAAAG AAGGGAAAAA AATTAGTGTN AATGAGCRA      420
GAAATAGTAA GTCTCRAACA ACNGCAAAI TCCCCTTGG GCAGAAGAC AGTCATCITA      480
GTAAATCAGG AATAANTGAA CTINGGATG TTAATGACCC TTGGCTGGN GACAAGGTT      540
GAAATTTGC CCTCCCCACT CCTGTTGCA GCAGAATANC GTATGAAATG TTAATGAAAC      600
TGAGGGCCAG GGTGTAACA ACCCAITCCA TCCTGACCCC ACTTGGCCA TATAGTATA      660
CC                                                                                   662

```

## (2) 配列番号27の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 399 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 27 :

CATGTATGTT CAGTCACATA TGCCAAAGGCC AAAGAAGATG CCTGCTTTG TGTCTCTCTA	60
CCTTATTCCT TTAGAARAGGG CTGTTCTGTC ACATGGAGGT CTGCTAGCAG CCAGTTCCTT	120
TCTCTCTCTA CCTAGGGTT ACAGGTAGGT AGCCATGGCT ACACCTACT CTTTATGTGA	180
GTGCTGGAGA TTCTGAAAA NCTCCCTATG CTGTGTGGC TAGCAGCTC ACCCACTAAG	240
CAAGCCATCT ATCTTGCAAG TCAGCATTTT GATTTTCTTC TATGAAGCCT ATCAGGAGGG	300
AAGCTGCAAT TAAAAAATA TCTATTATA CTTAGGTCAT TTGATCCTA CAATCCAAAG	360
CTATGAAATG AACTTGGATT CTTTTCGTTA TTCAAAAC	399

(2) 配列番号 28 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 399 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 28 :

AAACGGCCGC GGTATCCTGA CCGTGCAAG GTAGCTAAT CACTGTTC TTAATTAGGG	60
ACTAGAATGA ATGGCTAACC GAGGGTTCA CTGTCTCTA CTTTCATCA GTGAAATTGA	120
CCTTCCAGTG AAGAGGCTGG AATCTCCCA TAGACGAGG AGACCTATG GAGCTTTAAT	180
TTACTAGTTC AACTTATATA AAAACAACCT AATGGGCTTA AACAAATTA ATATGACTA	240
AAAAATTTCG GTTGGGGTGA CCTCGGAGA TAAAAATCC TCCGATGAT TTACCTAG	300
ACTCACAGT CRAAGTAATA CTAATACTT ATTGACCCCA TTATGATCA ACGGACCAAG	360
TTACCCTAGG GATACACGG CAATCCTATT TAAGAGTC	399



## (2) 配列番号29の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 272 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号29 :

```

ATGGCTCCAGC GACTTCTTCT GAGGAGGTTG CTGGCCTCTG TCATCTCCAG GAAGCCTCTT    60
CAGGGTCAGT GGGCACCCCT CACTTCCAAA GCCCTGCRGA CCCCACAATG CAGTCTCTGT    120
GGCCTGACTG TAACACCCAA CCCAGCCCGG ACAATATACA CACGAGGAT CTCCTTGRCA    180
ACCTTTAATA TCCAGGATGG ACCTGACTTT CAAGACCGAG TGGTCAACAG TGAGACACCA    240
GTGGTGTGCG ATTTCACGCG ACAATGAGTA TT                                272

```

## (2) 配列番号30の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 145 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号30 :

```

GCCTTTTGAG GTGGTGTGGA CCCTGCACGA TCCTGGGGCC GAGGTTACAG AAGATGGTGG    60
CCACAGACGA CCGGAAGGTG GTGATGGCCA AGGTGGATAT TGATGACCAC ACAGACCTCG    120
CCATTGAGTA TGAGGTATGG ATTGA                                145

```

## (2) 配列番号31の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 158 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 3 1 :

TCCACCCGAG TGTACGCGGT GCCCACTGTG CTGGCCATGA AGAATGGGGA CTTGGTGAGC 60  
 AAGTTTGTGG GCATCAAGGA TGAGGTCAG TTGGAGGCGT TCTGAAGAA GCTGATTGGC 120  
 TGACAAGCAG GAGTGAATCC TGGTCCCTT GCCCGCGT 150

(2) 配列番号 3 2 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 20 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 3 2 :

GATGGCTCAG CGACTTCTTC 20

(2) 配列番号 3 3 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 23 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 3 3 :

GGTGGTGTGG ACCCTGCAAG ATC 23

(2) 配列番号 3 4 の配列の情報 :

(i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 23 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号 3 4 :

CCACCTTGGC CACACCCACC TTC

23

## (2) 配列番号35の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 23 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号35 :

GGCAGGGGA CCAGGCTCA TCC

23

## (2) 配列番号36の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 14 amino acids

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号36 :

Val	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Thr	Trp	Cys	Gly	Pro	Cys	Lys
1					5						10		

## (2) 配列番号37の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 23 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号37 :

AACCTTTATC GTCCAGGATG GAC

23

## (2) 配列番号38の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 22 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号38 :

GCTGGGAGTT CTACTAGGTT CC

22

## (2) 配列番号39の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 25 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号39 :

CCAAAATGGT GAAGCTGATC GAGAG

25

## (2) 配列番号40の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 25 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号40 :

TGATTAGGCA AACCCGTAA TAGTG

25

(2) 配列番号41の配列の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 配列の長さ：18 base pairs

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号41：

CTGGCACAC ACCTTCIA

16

(2) 配列番号42の配列の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 配列の長さ：18 base pairs

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号42：

GAGCAAGTG TGGTGAC

18

(2) 配列番号43の配列の情報：

(i) 配列の性質：

(A) 配列の長さ：48 base pairs

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(xi) 配列：配列番号43：

CACCACCTTC CCGTGTGTG TGGTACCAI CTCTCTAAC CGAGGTG

48

## (2) 配列番号44の配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 48 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号44 :

CTGGAATGTT GGCATGCATT TGACTTCACA CTCGAGCA ACATCTCTG

48

## (2) 配列番号45配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 21 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号45 :

GATGACCCAG ATCATGTTTG A

21

## (2) 配列番号46配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

- (A) 配列の長さ : 33 base pairs  
 (B) 配列の型 : 核酸  
 (C) 鎖の数 : 一本鎖  
 (D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号46 :

ACCACCCAGG TCCTATGAC AACCTTTAAC GTC

33

## (2) 配列番号47配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 32 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号47 :

CTGGCCGGAT CCTGCTTAT CAGCCAATTA GC

32

## (2) 配列番号48配列の情報 :

## (i) 配列の性質 :

(A) 配列の長さ : 48 base pairs

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(xi) 配列 : 配列番号48 :

GACAACTCTG TCCTGAAGT CAGGTCCATC CTGGACGTTA AAGTTTGT

48

【図1】

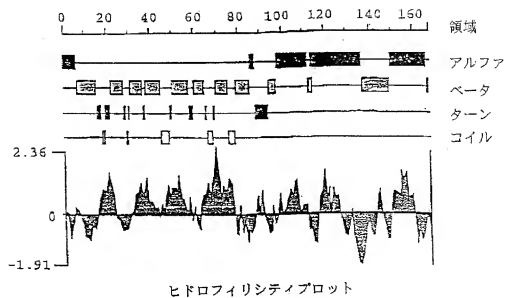
Fig. 1A

TGA CGG GCA GGC CGG CTG GGC TCT GCA TCC CTC TGC TCA CAC TGC CGG  
 \*\*\*  
 GAG ATG GCT CAG CGG CTT CTC CTG AGG AGS TTC CTG ACC TCA GTC ATC  
 M A Q R L L L R R F L T S V I  
 TCC AGG AAG CCT CCT CAG GGT GTG TGG GCT TCC CTC ACC TCT ACG AGC  
 S R K P P Q G V W A S L T S T S  
 CTG CAG ACC CCT CCG TAC AAT GCT GGT GGT CTA ACT GGA ACA CCC AGC  
 L Q T P P Y N A G G L T G T P S  
 CCT GCC CGG ACA TTT CAC ACC ACC AGA GTC TGT TCA ACA ACC TTT AAC  
 P A R T F H T T R V C S T T F N  
 GTG CAG GAT GGA CCT GAC TTT CAA GAC AGA GTT GTC AAC AGT GAG ACA  
 V Q D G P D F Q D R V V N S E T  
 CCA GTT GTC GTG GAC TTT CAT GCA CAG TGG TGT GGC CCC TGC AAG ATC  
 P V V V D F H A Q W C G P C K I  
 CTA GGA CCT CGG TTA GAG AAG ATG GTA GCC AAA CAG CAC GGG AAG GTG  
 L G P R L E K M V A K Q H G K V  
 GTG ATG GCC AAA GTG GAC ATT GAC GAT CAC ACA GAC CTT GCC ATT GAG  
 V M A K V D I D D H T D L A I E  
 TAC GAG GTG TCT GCT GTG CCT ACC GTG CTG GCC ATC AAG AAC GGG GAC  
 Y E V S A V P T V L A I K N G D  
 GTG GTG GAC AAG TTT GTG GGG ATC AAG GAC GAA GAC CAG CTG GAA GCC  
 V V D K F V G I K D E D Q L E A  
 TTC CTG AAG AAG CTA ATT GGC TGA CAAGCAGGGAAGAGGCCAGACTGCCCTTGCC  
 F L K K L I G \*\*\*  
 TGCTGGAAACCCATTGGGGAGGAACCTAGTAGAACTCCAGCCCTCAGCTGTCTATCCTTCGT  
 GCCCTGCCCTGTCTTTTGTCTTGTGGGTCTTGCCCTTTGGGCAGCAGACTTCCAAACCTAGAAG  
 CCACCGACACTTCAGAGCCAGCCCTCAGCCAGGATGCCAGAGAGGGGCAATGCTGCCGATG  
 GTGTGGAGGAGGGGCATCTGAGCACCTCCTACTGTGTGCTTCTCCTGTGCACCTACTGTGTG  
 CTTCTCTAGGGCTTGTTCCTATTCCCTAGATGCTAGACAAAGCCTGGGCCAGCCTGTATTC  
 ACCGCCCAGGCAATGGCCAGTCCTCGTCTCTGAGGTCCCTGTGATCTGAAGCCTCAGCCCCAC  
 ACACACACATGTGGCTCTGGTGTATTTCTCTCTCTGCTCTGCTTGAAGGAAACAAGAAGC  
 TGAACRAAGTGAGAGTAATGGATAATTCTCTCATCTTTGTAGGTCTGTAAATAAAGAACTTTAT  
 GTGATCCTTCTACCTCTCTGTGTGAAGAACAGAGCCACCCCATTCCTATCTCTGTCCCTTC  
 TCTTCTTGTACCTCCCTGGGTAGCTGGGCCTTGGTTCTGTCTCCCTGAGCAGGAGGAGGA  
 GCTGTGAACAAGCAGACCAATAAACCAAGGTTTGCAATTGCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA



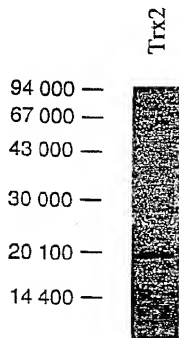
【図1】

Fig. 1B



【図2】

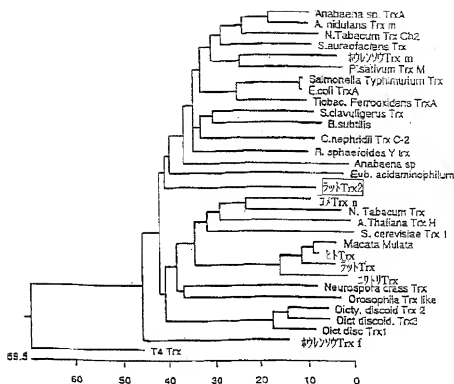
Fig. 2





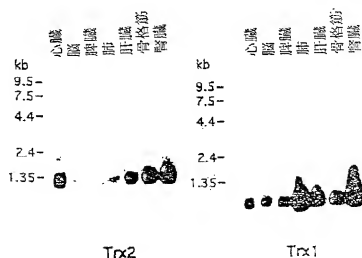
【図4】

Fig. 4



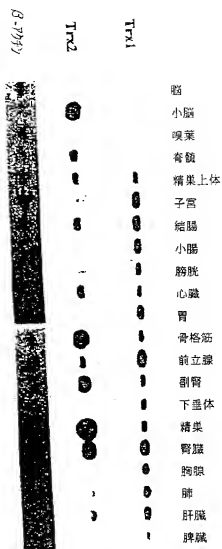
【図5】

Fig. 5



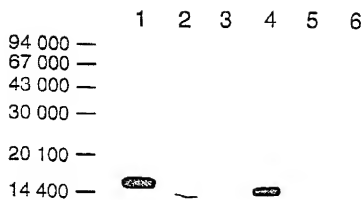
【図6】

Fig. 6



【図7】

Fig. 7



【図8】

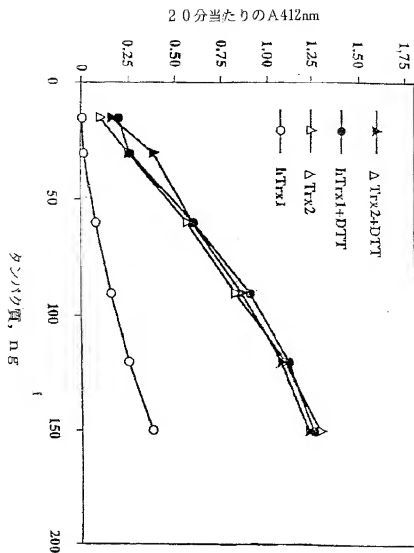


Fig. 8

【図9】

Fig. 9

10	20	30	40
ATGGCTCAGC	GACTTCTTCT	GAGGAGGTTT	CTGGCTCTG 40
TCATCTCCAG	GAAGCCCTCT	CAGGGTCAGT	GGCCACCCCT 80
CACCTTCCAA	GCCCTGCAGA	CCCACAATG	CAGTCTGGT 120
GGCTTGACTG	TAACACCCAA	CCCAGCCCG	ACAATATACA 160
CCACGAGGAT	CTCCTTGACA	ACCTTTAATA	TCCAGGATGG 200
210	220	230	240
ACCTGACTTT	CAAGACCGAG	TGGTCAACAG	TGAGACACCA 240
GTGGTTGTGG	ATTTCACGCG	ACAGTGGTGT	GGACCTTGCA 280
AGATCCTGGG	GCCGAGGTTA	GAGAAAGATG	TGGCCTAGCA 320
GCACGGGAAG	GTGGTGATGG	CCAAGGTGGA	TATTGATGAC 360
CACACAGACC	TGCGCATTGA	GTATGAGGTG	TCAGCGGTGC 400
410	420	430	440
CCACTGTGCT	GGCCATGAAG	AATGGGGACG	TGGTGGACAA 440
GTTTGTGGGC	ATCAAGGATG	AGGATCAGTT	GGAGGCCTTC 480
CTGAAGAAGC	TGATTGGCTG	A	501

【図10】

Fig. 10

10	20	30	40
MAQRLLRRF	LASVISRKPS	QGOWPLTSK	ALQTPQCSFG 40
GLTVTPNPAR	TIYTRISLT	TFNIOGPDF	ODRVNSETP 80
VVVOFHAQWC	CPCKILGPRL	EKMVAKQHGK	VVMKAYDIDD 120
HTDLAIEYEV	SAVPTVLMK	NGDVYDKFVG	IKDQDLLEAF 160
LKKLIG.	167		







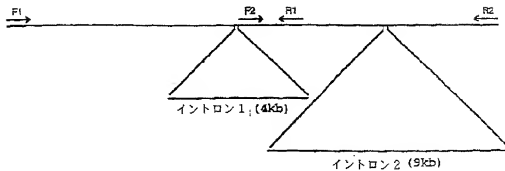
【図12】

4. CTGCTCAGAGCAAGACTGTACGAATGACAGGGTATCAAGTCTGGGTAAATATTCATGCATTTTAATTGAACACCCGAGG  
AAATTTTGAGAAATAAGAGTGAAGAGAAACCTTTAAATGCCCCATAGAGAAGCCCTAGCCCTGATTTCTTTAGAGAT  
TACCTTGCATTGGCGTGGAAACATAAATCTCTCGTAGAATGTTTTAAATGTTGAAGTTAAATTTACATCTTTTACCAAT  
GTGTCCTCCCTGAGAAATCTTTGGTACTGTCAGAAATAGTAAACAGATTCTTTAAAGGGCTCANGTAAAGAGCTGTAGAA  
AAGTCCAGAAAGAACTGGGTACGATTCCAGAGGTTNGGTACCTGTATCANAAGAGGGGANAGAAATTAAGAAGGGGAAAA  
AATTAGTGTNAATAGCAAGAAATAGTAAGTCTCAACAACAGACAAATCCCACCTGGGCAGAGAAACAGTCATCTTA  
GTAATCACAGANAANTGAACCTTNGGATGTNAATGACCCCTTGGCTGGANGACAAGGGTTGAAAAATTTGCCCTCCCAATT  
CCCTGTTGCAGCAGANTACGTATGAAAATGTTAAGTGAACCTGAGGGCCAGGGTTGANACAAACCAATTCATCTCTGACCCC  
ACTTGGCCCATACTGATACC
4. CATGTATGTTCACTACATATGCCAAGGCCAAGAAGATGCCCTGCTTTGTCTCTCTACCTTATTCCTTTAGAAAGGG  
CTGTTCTGACACATGGAGGCTGCTAGCAGCCAGTTCTGCTCTCTACCTTAGGGTTACAGGTAGGTAGCCACTGGCT  
ACCCCTACTCTTTATGTGAGTGGTGAGATCTTGGAANCTCCCTATGCTGTGTGGCTAGCAGACTCACCCTAAG  
CAAGCCATCTATCTTGCAAGTCAGCATTTGATTTTCTATGAGGCCCTACAGAGGGAAGGTGCAATTAATAAAAAA  
TCTATTATCTTAGGTCAATTTGTATCTCTACAAATCCAAAGCTATGAATGAACCTTGGATGTTTTCTGTTATTCAAACAC
5. AAACGGCCGCGGTATCCTGACCGTGCAAGGTAGCATATCACTTGTCTCTTAATTAGGGACTAGAAATGGCTAAAC  
GAGGTTCAACTGTCTCTTACTTCAATCAGTGAATTTGACCTTCCAGTGAAGGGCTGGAATCTCCCAATGAAGACGAGA  
AGACCCTATGAGAGCTTAAATTTACTAGTTCACGTATATAAAACACCTAATGGGCTAAAAACAAAATAATATGAACTA  
AAAAATTTGGGTGGGGTGACCTCGGAGATAAAAAATCCTCCGAAATGATTTTAACCTAGACTCACAAAGTCAAGTAATA  
CTAATATCTTATTGACCCAAATTTATGATCAACGGGACCAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATCTCTATTAGAGATTCT

【図13】

Fig. 13

ATG GCT CAG CGA CTT CTT CTG AGG AGG TTC CTG GCC TCT GTC ATC TCC AGG AAG  
 1  
 CCC TCT CAG GGT CAG TGG CCA CCC CTC ACT TCC AAA GCC CTG CAG ACC CCA CAA  
 TGC AGT CCT GGT GGC CTG ACT GTA ACA CCC AAC CCA GCC CGG ACA ATA TAC ACC  
 ACG AGG ATC TCC TTG ACA ACC TTT AAT ATC CAG GAT GGA CCT GAC TTT CAA GAC  
 CGA GTG GTC AAC AGT GAG ACA CCA GTG GTT GTG GAT TTC CAC GCA CA: GTGAGTA  
 88  
 TT...INTRON 1 (4kb)...GCCTTTGAG :G TGG TGT GGA CCC TGC AAG ATC CTG GGG  
 89  
 CCG AGG TTA GAG AAG ATG GTG GCC AAG CAG CAC GGG AAG GTG GTG ATG GCC AAG  
 GTG GAT ATT GAT GAC CAC ACA GAC CTC GCC ATT GAG TAT GAG :GTATGGATTGA...  
 109  
 INTRON 2 (9kb)...TCCACCCAG: GTG TCA CGG GTG CCC ACT GTG CTG GCC ATG AAG  
 110  
 AAT GGG GAC GTG GTG GAC AAG TTT GTG GGC ATC AAG GAT GAG GAT CAG TTG GAG  
 GCC TTC CTG AAG AAG CTG ATT GGC TGA CAAGCAGGGATGAGTCCTGGTTCCCTTGCCCGCGT  
 156 \*

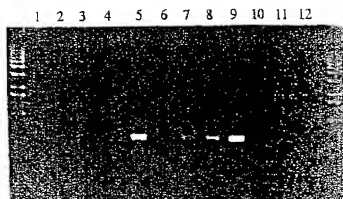


プライマー F1: 5'-GATGGCTCAGCGACTTCTTC  
 プライマー F2: 5'-GGTGGTGTGGACCTGCAAGATC  
 プライマー R1: 5'-CCACCTTGGCCATCACCACCTTC  
 プライマー R2: 5'-GGCAAGGGAACCAGGACTCATCC

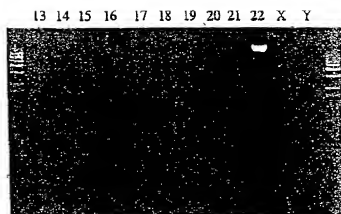
【図14】

Fig. 14

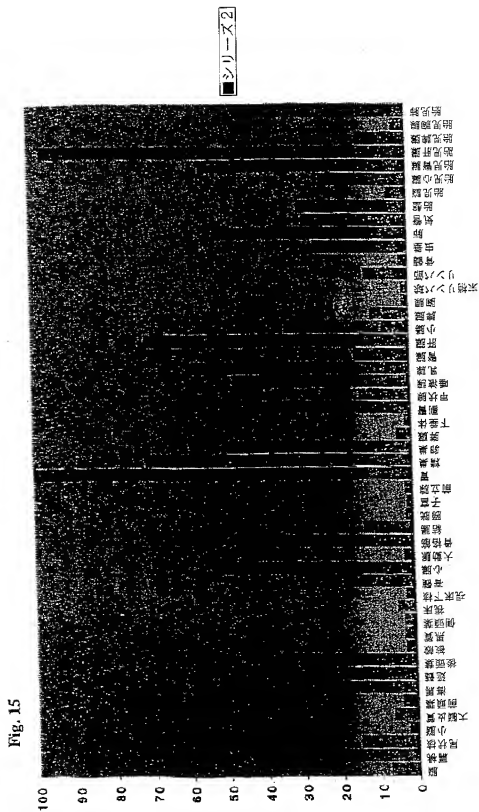
染色体



染色体

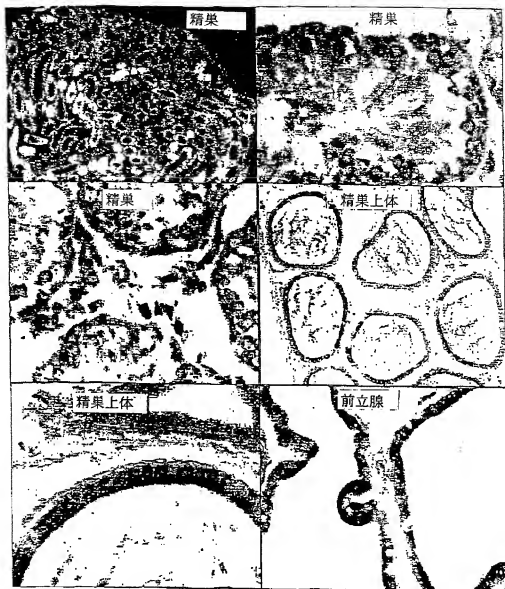


【例 15】



【図16】

Fig. 16



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern: at Application No  
 PCT/GB 98/00263

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 IPC 6 C12N15/53 C12N9/02 A61K38/44 C12N15/85 C12N15/70  
 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/40 G01N33/68 A61K67/027  
 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of database used, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL Database Entry HS898283 Accession number N41898; 27 January 1996 HILLIER L. ET AL.: "The WashU-Merck EST Project" XP002967407 see the whole document ---	1-4, 6, 7, 24-26, 30, 31
X	EMBL Database Entry MM927 Accession number W91827; 9 July 1996 MARRA M. ET AL.: "The WashU-HMII Mouse EST Project" XP002967408 see the whole document ---	1-4, 7, 24-26, 30, 31

-/-

☒ Further documents are cited in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier document not published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 June 1998

Date of mailing of the international search report

20.07.98

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.O. Box 5518 Patentkanal 2  
 NL-2280 HV Rijswijk  
 Tel: (+31-70) 340-3040, Tlx: 31 851 apo nl  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Index of Application No  
 PCT/GB 98/00263

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>XILLIN REN ET AL.: "Mutagenesis of structural half-cystine residues in human thioredoxin and effects on the regulation of activity by selenodiglutathione" BIOCHEMISTRY, vol. 32, no. 37, 21 September 1993, EASTON, PA US, pages 9701-9708, XP002067403 cited in the application            see page 9701, left-hand column, paragraph 1 - page 9702, left-hand column, paragraph 1; figure 1            see page 9703, right-hand column, paragraph 3 - page 9704, left-hand column, paragraph 1            ---</p>	1,2,4,6, 8,9,21, 24-35
X	<p>EP 0 425 821 A (AJINOMOTO CO., INC.) 8 May 1991            see page 2, line 11 - line 28            see page 3, line 16 - page 4, line 50            ---</p>	8-20,32, 37-40
A	<p>HARTHARAN J ET AL.: "Alternative forms of the human thioredoxin mRNA: identification and characterization" GENE, vol. 173, no. 2, 16 September 1996, page 265-270 XP004043228            see page 266, left-hand column, paragraph 2 - page 269, right-hand column, paragraph 1            ---</p>	1-9, 21-36
A	<p>JOHANNA BODENSTEIN ET AL.: "characterization of two thioredoxins in pig heart including a new mitochondrial protein" ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG, vol. 46, no. 3-4, 1991, pages 270-279, XP002067404            see the whole document            ---</p>	1-40
P,X	<p>GIANNIS SPYROU ET AL.: "Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 5, 31 January 1997, MD US, pages 2936-2941, XP002067405            see abstract            see page 2936, left-hand column, paragraph 2 - page 2938, right-hand column, paragraph 1            see page 2939, right-hand column, paragraph 1 - page 2940, right-hand column, paragraph 1            ---</p>	1-40

-/--



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No.

PCT/GB 98/06263

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with a citation, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SHOJI NATABE ET AL.: "SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 249, no. 1, October 1997, pages 52-60, XP002067406</p> <p>see abstract</p> <p>see page 53, left-hand column, last paragraph - right-hand column, line 2</p> <p>see page 53, right-hand column, last paragraph - page 54, left-hand column, paragraph 2</p> <p>see page 55, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1; figure 4</p> <p>see page 56, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1</p> <p>see page 57, right-hand column, paragraph 4 - page 58, left-hand column, paragraph 2</p> <p>-----</p>	<p>1-4,7-9, 21,22, 24-35</p>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. application No.  
PCT/68 98/08263
**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 37-40 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Number of Application No

PCT/GB 98/00253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 425821 A	08-05-1991	DE 69011465 D	15-09-1994
		DE 69011465 T	23-03-1995
		JP 3284818 A	06-09-1991
		US 5216073 A	11-05-1993
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テマコード (参考)
A 6 1 P 29/00		A 6 1 P 43/00	1 0 5
39/00		C 0 7 K 14/47	
43/00	1 0 5	16/18	
C 0 7 K 14/47		C 1 2 N 1/19	
16/18		1/21	
C 1 2 N 1/19		9/02	
1/21		C 1 2 P 21/02	C
5/10		C 1 2 Q 1/68	A
9/02		G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		5/00	B
G 0 1 N 33/53		A 6 1 K 37/02	